

**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des Sciences Biologiques**

*Année : 2013/2014*



*N° d'enregistrement :*

.....

**THESE**

**Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat ès sciences**

**en Biologie**

**Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien): Activité biologique**

**Présentée et soutenue publiquement**

**Par :**

**Mr BOUAL Zakaria**

**Le 15/06/2014**

**Devant le jury composé de :**

HADJ MAHAMMED Mahfoud	Professeur	Univ. Ouargla	Président
OULD EL HADJ Mohamed Didi	Professeur	Univ. Ouargla	Promoteur
MICHAUD Philippe	Professeur	Univ. Clermont Ferrand	Co-Promoteur
OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Professeur	Univ. Ouargla	Rapporteur
CHERITI Abdelkrim	Professeur	Univ. Béchar	Rapporteur
BOURAS Nouredine	Maître de conférences (A)	ENS Kouba, Alger	Rapporteur

## Remerciements

*Au terme de ce travail, je remercie Dieu «Tout Puissant» de m'avoir accordé la force et le courage afin de réaliser ce modeste travail.*

*Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un axe de recherche du laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides. Je remercie infiniment son Directeur, le Professeur OULD ELHADJ Mohamed Didi, de m'avoir permis de mener ce projet à la frontière de la chimie, de la biochimie et de la microbiologie, et de m'avoir soutenu en plusieurs occasions qui ne se limitent pas à l'aspect scientifique de ce travail. C'est dans ce laboratoire présentant, un environnement stimulant que j'ai eu le plaisir de passer et de poursuivre mes années de perfectionnement scientifique.*

*Je voudrais adresser toute ma reconnaissance à mon Directeur de thèse, Monsieur OULD ELHADJ Mohamed Didi, Professeur au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah Ouargla. Je vous remercie de m'avoir accueilli chaleureusement dans votre équipe de recherche, de m'avoir soutenue durant des périodes tempétueuses pour moi, merci de m'avoir fait bénéficier de votre pédagogie, votre écoute, votre ouverture d'esprit, malgré votre emploi du temps surchargé. Votre vision de la recherche scientifique, est très importante pour moi et vos connaissances éclectiques ont largement contribué à l'évolution de la présente étude. Merci de m'avoir enseigné la pratique des sciences et la rigueur de la démarche expérimentale, de m'avoir transmis votre capacité d'enthousiasme et votre force, merci de m'avoir offert cette grande liberté de travail et de m'avoir permis de présenter quelques uns de nos résultats lors de congrès internationaux. J'ai énormément appris auprès de vous et je garderai longtemps le souvenir de vos enseignements et de votre humanité.*

*J'exprime toute ma profonde gratitude à Monsieur Philippe MICHAUD, Professeur à l'Université Blaise Pascal- Clermont Ferrand (France), sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Je vous remercie vivement pour votre soutien qui m'a permis d'atteindre les objectifs visés. Je vous remercie pour le co-encadrement de ce travail, pour votre disponibilité et les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eu à échanger.*

*Je remercie Monsieur HADJ MAHAMMED Mahfoud, Professeur au Département de Chimie à la Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université Kasdi Merbah Ouargla, de m'avoir accueilli dans votre Laboratoire et d'avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail. Nous sommes particulièrement honoré de vous avoir vu assurer la Présidence de ce Jury de thèse, mais aussi pour votre présence et vos conseils tout au long de ces quatre années.*

*Mes remerciements s'adressent également à Madame OULD ELHADJ –KHELIL Aminata, Professeur au Département des Sciences Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Nous sommes très honoré d'avoir bénéficié de vos remarques et corrections. Nous tenons à vous assurer de notre grande estime et de notre profonde gratitude, merci pour toute votre attention, votre disponibilité et pour tous vos précieux conseils. J'exprime toute ma reconnaissance aussi à Monsieur le Professeur CHERITI Abdelkrim de l'Université de Bechar et Monsieur BOURAS Noureddine Maître de conférences-HDR, à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail. Nous vous remercions pour l'ensemble de vos remarques ainsi que pour votre disponibilité qui nous a permis de partager d'enrichissantes conversations.*

*Mes remerciements vont également à Monsieur Guillaume PIERRE, Docteur à l'Université Blaise Pascal- Clermont Ferrand (France), pour l'analyse structurale des polysaccharides et pour les discussions enrichissantes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, dans le cadre d'une collaboration entre nos deux institutions (Université Kasdi Merbah-Ouargla/Institut Pascal), ainsi qu'à tous les membres de l'équipe de l'Institut Pascal de l'Université Blaise Pascal- Clermont Ferrand (France), dirigé par le Professeur Philippe MICHAUD, pour nous avoir très soutenu et impliqué dans certains de vos projets, malgré l'éloignement géographique, nous nous sommes toujours sentis intégré à votre équipe.*

*Je remercie vivement les membres de l'équipe du Laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, particulièrement son Directeur le Professeur HADJ MAHAMMED Mahfoud, merci pour l'aide et la collaboration.*

*Je présente mes remerciements les plus sincères au Laboratoire d'analyse médical «IBN ROCHD» en particulier son Directeur Dr. AMMI SAÏD Mustapha de m'avoir accueilli au sein du laboratoire, ainsi qu'à tous les membres de ces équipes au Laboratoire IBN ROCHD et au laboratoire de la clinique des Oasis GHARDAIA, Messieurs MEHARZI Brahim, BEKAI Abdelaziz, REFIS Mohamed, ALALOUBANI Salah, BAHEDI Baelhadj, FARTAS Youcef et MOSBAH Said, pour votre bonne humeur, pour votre soutien et votre aide.*

*Je tiens à remercier le Laboratoire de Phytochimie et Synthèse Organique de L'Université de Béchar en particulier son Directeur le Professeur CHERITI Abdelkrim, merci pour votre aide et votre collaboration pour l'étude des métabolites secondaire.*

*Enfin, tout ceci n'aurait pas été possible sans le soutien de ma famille et de mes amis, bien qu'ils l'ignorent sûrement. J'espère que ces quelques mots répareront cette erreur.*

*A mes parents : «merci, cette thèse est la vôtre».*

*BOUAL Zakaria*

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Différentes étapes de l'extraction des phénols totaux par macération	32
02	Différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydrosoluble de la partie aérienne d' <i>Asphodelus tenuifolius</i>	36
03	Différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydrosoluble des graines et de bulbes	37
04	Processus de l'hydrolyse des polysaccharides dans différentes conditions opératoires	44
05	Méthode de triméthylsilylation des O-glycosides	46
06	Etapas de test de fixation du complément	52
07	Différentes étapes du test CH <sub>50</sub>	54
08	Différentes étapes du test CI <sub>50</sub>	59
09	Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides d' <i>A. armatus</i> , système 1	77
10	Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides de <i>P. notata</i> , système 1	78
11	Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d' <i>U. noctiflora</i> , système 1	80
12	Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d' <i>A. tenuifolius</i> , système 1	83
13	Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides d' <i>A. armatus</i> , système 2	84
14	Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides de <i>P. notata</i> , système 2	86
15	Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d' <i>U. noctiflora</i> , système 2	87
16	Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d' <i>A. tenuifolius</i> , système 2	89
17	Chromatogrammes des étalons	90
18	Courbe d'étalonnage des composés furfuraliques	91
19	Suivi de la formation des composés furfuraliques	92
20	Profil GC/MS-EI des méthylglycosides triméthylsilylés issus des polysaccharides d' <i>Astragalus armatus</i>	95
21	Profil GC/MS-EI des méthylglycosides triméthylsilylés issus des	98

	polysaccharides de <i>Plantago notata</i>	
<b>22</b>	Profil GC/MS-EI des méthylglycosides triméthylsilylés issus des polysaccharides d' <i>Urginea noctiflora</i>	103
<b>23</b>	Profil HPAEC-PAD de l'hydrolysats de polysaccharides hydrosolubles extrait de la partie aérienne d' <i>Asphodelus tenuifolius</i>	106
<b>24</b>	Degré de la lyse des hématies A <sup>+</sup> sensibilisées, par le complément de sérum humain A <sup>+</sup>	109
<b>25</b>	Degré de la lyse des hématies B <sup>+</sup> sensibilisées par le complément de sérum humain B <sup>+</sup>	109
<b>26</b>	Pourcentage d'inhibition de l'activité de complément	111
<b>27</b>	CCM des hydrolysats des polysaccharides avant et après fermentation par <i>S. cerevisiae</i>	114
<b>28</b>	Suivi de la croissance de <i>L. casei</i> sur MRS complémenté par différentes sources carbonées estimée par mesure de DO à 570nm	116
<b>29</b>	Valeurs de pH de milieu MRS complémenté par différentes sources carbonées mesuré à température de 27°C	118

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisées	12
02	Origine et types d'appareils utilisés au cours de l'expérimentation	13
03	Caractéristiques physicochimiques des solutions tampons préparation et utilisation des solutions de $\text{NaN}_3$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{MgCl}_2$ et $\text{HCl}$	14
04	Méthode de dilution du sérum	55
05	Différentes dilutions du test $\text{CH}_{50}$	55
06	Différentes dilutions de l'héparine	57
07	Formulation des différentes dilutions de polysaccharides des plantes testées	57
08	Différentes dilutions du test $\text{CI}_{50}$	60
09	Hydrolysats des polysaccharides et les conditions d'hydrolyse	61
10	Composition chimique et biochimique du matériel végétal étudié	67
11	Rendement d'extraction, teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et activités antioxydantes (AAO) des extraits	69
12	Rendements et composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles	73
13	Rapport frontal (Rf) des étalons des oses dans les deux systèmes de CCM	76
14	Quantification des monosaccharides composés des polysaccharides d' <i>Astragalus armatus</i> par HPAEC-PAD et GC/MS-EI	94
15	Quantification des monosaccharides composés des polysaccharides de <i>Plantago notata</i> par HPAEC-PAD et GC/MS-EI	97
16	Quantification des monosaccharides composés des polysaccharides d' <i>Urginea noctiflora</i> par HPAEC-PAD et GC/MS-EI	102
17	Quantification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides d' <i>Asphodelus tenuifolius</i> par HPAEC-PAD	107
18	Acidité titrable exprimés en g/l d'acide lactique des milieux MRS complémentés par les hydrolysats des polysaccharides	119

## Liste des photos

Photos	Titre	Page
<b>Photo 1 :</b>	<i>Asphodelus tenuifolius</i> Cavan. ( <i>Liliaceae</i> ) au stade floraison (Oued Nechou, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est Algérien "2009") (Originale)	18
<b>Photo 2 :</b>	<i>Urginea noctiflora</i> Batt et Trab. ( <i>Liliaceae</i> ) (Oued lachebour, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est Algérien "2014") (Originale)	20
<b>Photo 3 :</b>	<i>Astragalus armatus</i> (Lam.) ( <i>Fabaceae</i> ) (Oued laadira, laadira, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est Algérien "2014") (Originale)	22
<b>Photo 4 :</b>	<i>Plantago notata</i> ( <i>Plantaginaceae</i> ) de (Oued Nechou, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est Algérien (Photo Originale)	25



## Sommaire

Introduction	02
<b>Chapitre I.- Méthodologie de travail</b>	
I.1.- Principe d'étude	10
I.2.- Matériel d'étude	11
I.2.1.- Produits et appareillage utilisés	11
I.2.2.- Matériel biologique	11
I.3.- Analyses physico-chimiques et biochimiques	28
I.3.1.- Dosage des cendres	28
I.3.2.- Dosage des éléments minéraux	28
I.3.3.- Dosages des oses totaux	29
I.3.4.- Dosage des protéines	29
I.3.5.- Dosage des lipides	29
I.3.6.- Dosage des fibres brutes	30
I.3.7.- Extraction des composés phénoliques	30
I.4.- Etude des polysaccharides	33
I.4.1.- Extraction des polysaccharides des feuilles	34
I.4.2.- Extraction des polysaccharides des graines et de bulbes	34
I.4.3.- Précipitation des protéines	35
I.4.4.- Composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles	35
I.5. - Caractérisation structurale des polysaccharides	40
I.5.1.- Identification et dosage des résidus glycosidiques	41
I.5.1.1. - Hydrolyse des liaisons glycosidiques	41
I.5.1.2.- Identification et dosages des monosaccharides par CPG/MS-EI	45

I.5.2.3.- Chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD)	47
I.6.- Activités biologiques	49
I.6.1.- Activité anticomplément	49
I.6.2.- Activité prébiotique	60
<b>Chapitre II.- Résultats et discussion</b>	
II.1.- Caractérisation physico-chimique du matériel végétal	66
II.2.- Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et pouvoirs antioxydants	69
II.3.- Composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles	72
II.4. - Caractérisation des polysaccharides	75
II.4.2. - Caractérisation des résidus glycosidiques	75
II.4.2.1.- Optimisation des conditions d'hydrolyse	75
II.4.2.2.- Analyse des résidus glycosidiques	95
II.5.- Activités biologiques des extraits de polysaccharides hydrosolubles	107
II.5.1.- Etude de l'activité anticomplément	107
II.5.2.- Activité prébiotique des hydrolysats de polysaccharides hydrosolubles	113
Conclusion et perspectives	120
Références bibliographiques	124
Annexes	146
Résumés	159

## *Introduction*

Les polysaccharides sont des macromolécules biologiques largement répandues dans la nature. Ils peuvent être extraits des micro-organismes (xanthane, scléroglycane,...), des algues (alginate, carraghénane,...), des crustacés (chitine), des mammifères (héparine, chondroïtine sulfate,...) et des végétaux supérieurs (JOSEPH *et al.*, 2013). Ils sont constitués de chaînes de monosaccharides avec une diversité structurale énorme, concerne l'isomérisation, l'ordre et le nombre de monosaccharides reliés dans la macromolécule, l'anomérisation en carbone 1 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) de chaque monosaccharide, la configuration absolue des monosaccharides (D ou L), le type de liaisons glycosidiques à des chaînes ramifiées ou non ramifiées, ainsi les groupes fonctionnels adaptés aux différents rôles biologiques (COURTOIS, 2009).

Durant les deux dernières décennies, les chercheurs ont réévalué l'importance des glucides et, envisagent pour eux de nombreuses applications notamment dans le secteur biomédical, en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques, de leur abondance, de leurs sources renouvelables, non-toxiques et biodégradables (RENAUD *et al.*, 2005). C'est le cas des polysaccharides déjà très largement utilisés comme matière première dans les industries papetière et agroalimentaire. Extraits majoritairement des végétaux, ces polymères hydrosolubles établissent des interactions spécifiques avec l'eau et peuvent épaissir, stabiliser ou gélifier une solution, même à faible concentration (MIRHOSSEINI et AMID, 2012). L'intérêt des polysaccharides ne se limite pas à leurs propriétés rhéologiques: le rôle biologique de certains d'entre eux les désigne comme des molécules à activités immunomodulatrice ou prébiotique (ZHANG *et al.*, 2013b). Les plantes médicinales reprennent alors toute leur valeur bien qu'elles soient exploitées depuis fort longtemps. Reposant souvent sur une approche empirique, les propriétés biologiques des plantes et des substances naturelles qu'elles renferment, font actuellement l'objet de nombreux travaux. Il semble en effet que les pharmacopées traditionnelles soient revisitées de façon plus systématique ouvrant par là même la voie au développement de champs disciplinaires nouveaux. C'est le cas pour l'éthnopharmacologie et les phytomodulateurs. Les vertus stimulantes et immunomodulatrices des phytopolysaccharides sont déjà utilisées de façon empirique par la pharmacopée traditionnelle (BRUDIEUX, 2007). L'analyse de la littérature met en lumière des polysaccharides hydrosolubles extraits de plantes médicinales comme des composés multifonctionnels (DETERS *et al.*, 2005), avec plusieurs activités pharmacologiques; antitumorales (LIU *et al.*, 2007), antioxydantes (YE *et al.*, 2011), anti-virales (TALARICO *et al.*, 2005), anticoagulantes (ATHUKORALA *et al.*, 2006), anti-compléments (XU *et al.*, 2007), anti-

inflammatoires (WU *et al.*, 2007), anti-ulcéreuses (YE *et al.*, 2003), hypoglycémiantes (TONG *et al.*, 2008), etc.

En effet, le mécanisme de base des effets immunostimulants, antitumoraux, bactéricides et autres effets thérapeutiques des polysaccharides végétaux, semble avoir lieu par l'intermédiaire de la stimulation de macrophage et de la modulation du système de complément (SCHEPETKIN et QUINN, 2006).

Ainsi, le traitement actuel des troubles inflammatoires dans la médecine occidentale, implique l'utilisation extensive des médicaments non stéroïdiens anti-inflammatoires et les corticostéroïdes, qui ont des effets secondaires aux doses élevées et en cas d'utilisation prolongée. Ces deux groupes de drogues pharmaceutiques ne sont pas idéaux pour le traitement de l'inflammation (WANG *et al.*, 2013). De nos jours, une plus grande attention est concentrée sur la recherche des plantes médicinales et leur efficacité anti-inflammatoire, qui résulte de leurs caractéristiques multi-composantes et ses capacités à affecter plusieurs cibles et différentes voies de signalisation et d'atténuation de l'inflammation (DRAYTON *et al.*, 2006).

L'une des alternatives récentes les plus prometteuses au traitement antibiotique classique, est l'utilisation des immunomodulateurs pour améliorer les réponses de défense de l'hôte (TZIANABOS, 2000). Plusieurs types d'immunomodulateurs, ont été identifiés, y compris des protéines de mammifères tels que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et le facteur de stimulation des colonies granulocyte-macrophage (GM-CSF), ainsi que les substances isolées et purifiées à partir de micro-organismes. Les polysaccharides isolés à partir de sources botaniques (champignons, algues, lichens et plantes supérieures), ont également suscité beaucoup d'attention dans le domaine biomédical en raison de leur implication dans l'induction non spécifique du système immunitaire (WASSER, 2002). Bien que la compréhension du mécanisme d'action de ces substances, est encore en développement. Le mécanisme de base de l'immunostimulant, de l'anti-tumoral, de la bactéricide et d'autres effets thérapeutiques des polysaccharides végétaux, est supposé se produire par l'intermédiaire de la stimulation des macrophages et de la modulation du système du complément. Par conséquent, la modulation de l'immunité innée a un impact important sur la capacité de l'hôte à répondre rapidement et puissamment à un large éventail d'agents pathogènes (SCHEPETKIN et QUINN, 2006).

Le système immunitaire remplit une série de fonctions antimicrobiennes complexes, y compris la surveillance, le chimiotactisme, la phagocytose et la destruction des organismes visés. En effet, l'éventail de micro-organismes maintenus dans le contrôle par des phagocytes, inclut les mycètes, les bactéries et les cellules infectées (BEUTLER, 2004). L'apparition de nouveaux microbes pathogènes, est un problème grave, et des médecins doivent être disposés à diagnostiquer et soigner rapidement ces patients (GRUCHALLA et JONES, 2003). L'évidence récente suggère que le développement des stratégies préventives pour résister à la maladie pourrait certainement être une stratégie à long terme plus décisive et probablement plus efficace de soins de santé (HACKETT, 2003). Le développement de la thérapeutique originale, qui pourrait augmenter non spécifiquement l'immuno-réaction innée, représente une stratégie idéale pour aborder des soucis mondiaux courants de la façon de combattre les agents infectieux classiques et naissants. Des composés immunomodulateurs végétaux, ont été également employés dans les remèdes traditionnels pour différents problèmes médicaux et la recherche sur leurs sources, s'est développée exponentiellement ces dernières années.

L'effet antitumoral des polysaccharides a été reconnu par NAUTS *et al.* en 1946, en constatant que certains polysaccharides pourraient induire une rémission complète chez les patients atteints de cancer (ZHANG *et al.*, 2007a). De nombreuses études ont suggéré que les polysaccharides peuvent inhiber la croissance tumorale à travers des mécanismes telles la prévention de la tumorigenèse par la consommation orale de préparations actives; une activité antitumoral directe par induction de l'apoptose des cellules tumorales; l'activité immunopotentialisante en combinaison avec la chimiothérapie; et l'inhibition d'une métastase tumorale. L'activité antitumoral de fructane de type graminane isolé des racines d'*Achyranthes bidentata*, est médiée par l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire (JIN *et al.*, 2007). L'effet anticancéreux et anti-métastatique d'Angelan, polysaccharide pectique purifié des racines d'*Angelica gigas* Nakai, est médié par la stimulation de l'immunité de l'hôte et inhibent directement l'adhérence des cellules cancéreuses. Des polysaccharides isolés des racines d'*Astragalus membranaceus* ont montré un effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses, en régulant l'expression des gènes P53 et PTEN. En outre, les polysaccharides d'*Astragalus membranaceus* ont montré une grande efficacité dans le traitement de la leucémie. Ils induits efficacement la différenciation d'érythroïde en modulant les gènes LMO2, KLF1, Klf3, Runx1, EphB4 et SP1, et augmentent

l'expression de l'ARNm des  $\gamma$  globines et la synthèse de l'hémoglobine fœtale dans les cellules K<sub>562</sub> (ZONG *et al.*, 2012).

Les fractions polysaccharidiques des extraits aqueux des feuilles entières d'*Aloe arborescens*, sont avérées antidiabétiques. Elles peuvent abaisser la glycémie chez les souris normales et chez les souris diabétiques induites par l'alloxane (CHANG *et al.*, 2011). Des études *in vitro* et *in vivo* sur l'activité antidiabétique d'un hétéropolysaccharide acide extrait des fruits de *Lycium barbarum* (Solanaceae), ont entraîné des effets hypoglycémiant significatifs par augmentation du métabolisme de glucose et la sécrétion croissante d'insuline et en favorisant la prolifération pancréatique de cellules  $\beta$  (ZHU *et al.*, 2013). HU *et al.* (2013b) ont purifié un polysaccharide original des graines de *Plantago asiatica*. Ils ont testé *in vitro* ses activités sur le fonctionnement intestinal, qui ont prouvé qu'il a une influence notable sur le ralentissement de diffusion de glucose et même empêcher l'enzyme  $\alpha$  amylase. Ceux-ci pourraient aider à prolonger la réponse du glucose dans le sang et augmenter le control de la glycémie post prandial.

Des polysaccharides extraits des feuilles et de tégument des graines des espèces végétales tels que *Plantago afra*, *Plantago psyllium*, *Plantago ovata* forsk (l'isabgul), *Plantago indica* et *Plantago major*, possèdent des effets laxatifs. Ils sont utilisés aussi comme lubrifiants (SAMUELSEN, 2000; XU *et al.*, 2004). De même, un polysaccharide de type hétéroxylane hautement ramifié, a été isolé des graines de *Plantago asiatica*. Il pourrait induire la maturation des cellules dendritiques de murines, et avoir une activité antioxydante *in vitro* et favoriser la défécation (HU *et al.*, 2013a).

Les hétéropolysaccharides d'*Astragalus mongholicus*, ont un pouvoir antioxydant et augmentent les activités antioxydantes des enzymes dans les reins de souris. Elles améliorent la fonction urinaire de la vessie (ZHANG *et al.*, 2011). Les graines de *Plantago asiatica* sont l'une des matières médicales traditionnelles les plus populaires utilisées en Chine et dans d'autres pays asiatiques. Les résultats de l'activité de balayage des radicaux libres ont prouvé que leurs polysaccharides ont une activité antioxydante significative (YE *et al.*, 2011).

*Maytenus ilicifolia* est l'une des plantes médicinales fréquemment utilisées au Brésil. Ces feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement efficace

des ulcères d'estomac. CIPRIANI *et al.* (2009) ont montré un effet protecteur anti-ulcère d'un galacturonane extrait des feuilles, qui avait inhibé significativement les lésions gastriques induit par l'éthanol chez le rat. Il a été suggéré que ce polysaccharide peut donc jouer un rôle important dans l'effet anti-ulcère de *Maytenus ilicifolia*.

Les effets anti-compléments des polysaccharides issus de plantes médicinales reçoivent une attention répandue. Il faut noter les études de ZHAO *et al.* (1994) sur les polysaccharides neutres des feuilles d'*Artemisia princeps*, MICHAELSEN *et al.* (2000) sur les polysaccharides des graines de *Plantago major* et XU *et al.* (2007) sur les polysaccharides des racines de *Bupleurum smithii*.

Des pectines ayant une activité anti-complément ont été isolées à partir de plusieurs plantes telles que les racines de *Glycyrrhiza uralensis* (ZHAO *et al.*, 1991), *Bupleurum falcatum* (YAMADA *et al.*, 1989) et *Angelica acutiloba* Kitagawa (KIYOHARA *et al.*, 1988) qui sont des espèces végétales utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise. Une activité anti-complément appréciable est notée par YAMADA *et al.* (1986), dans un polysaccharide isolé des graines de *Plantago asiatica*. C'est un polysaccharide acide de type  $\beta$ -D-xylopyranan partiellement O-acétylé, avec des ramifications composées de d'acide  $\alpha$ -D-glucopyranosyluronic. *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae), plante médicinale largement répandue en Europe et en Asie, est utilisée traditionnellement pour le traitement du rhumatisme, des ulcères et des troubles digestifs. XIE *et al.* (2007) ont isolés à partir des fleurs de *Tanacetum vulgare* des hétéropolysaccharides acides à activité anti-complément. L'écorce de l'arbre *Cola cordifolia* (Sterculiaceae) est utilisée en médecine traditionnelle malienne comme un remède pour la cicatrisation des blessures, analgésique, et antidiarrhéique. Il contient des polysaccharides ayant des activités anti-complément inhabituelles (AUSTARHEIM *et al.*, 2012).

La naissance du concept prébiotique, vers la fin des années 1990, a poussé les scientifiques à s'intéresser aux propriétés médicinales des composés prébiotiques (HU *et al.*, 2013a). Un grand nombre de vertus, est attribué aux prébiotiques, dont son rôle stimulateur de la flore intestinale (GENESTIE, 2006). Leur présence dans le côlon accroît la masse bactérienne fécale. Cela entraîne une meilleure consistance des selles. Les sujets aux constipations voient augmenter leur fréquence d'expulsion. Il a également été démontré qu'ils stimulaient la prolifération de certaines bactéries lactiques. Les prébiotiques augmentent l'absorption des minéraux, dont le magnésium



et le calcium, une fois que ces derniers arrivent au niveau du côlon. Ils réduisent les pertes provoquées par les tissus osseux. De récentes recherches d'ordre épidémiologique ont également assuré que les prébiotiques intervenaient dans le bon fonctionnement du système immunitaire et détiennent une action protectrice contre le cancer du côlon. En plus, la consommation de prébiotiques, améliore nettement les lipides sanguins. D'autres effets possibles, sont en cours de tests scientifiques. Il s'agit de leur action sur la prophylaxie, les infections gastro-intestinales, la diminution du taux de cholestérol présent dans le sang ainsi que l'apparition du diabète (SAAD *et al.*, 2013).

Seulement peu d'oligosaccharides sont naturellement produits, ainsi des stratégies ont été développées pour les obtenir, par la dépolymérisation des polysaccharides ou par la synthèse. Le premier processus est considéré en tant que plus concurrentiel parce qu'une large variété d'oligomères peut être obtenue à partir d'un polymère, alors que la synthèse est longue et chère, et seulement de petites oligomères peuvent être produites (CHEN *et al.*, 2013).

Toutefois, aucune étude sur les polysaccharides et leurs effets anti-inflammatoires, ne porte sur des plantes spontanées à caractère médicinal, utilisées par les populations autochtones de la région de Ghardaïa, située au Sahara septentrional Est algérien. Le présent travail recherche des polysaccharides hydrosolubles de quelques plantes spontanées réputées dans cette zone saharienne, par leurs effets officinaux. L'étude porte sur la composition chimique, l'identification structurale, et les effets biologiques de ses polysaccharides. L'activité anti-complément des polymères et l'activité prébiotique des hydrolysats qui pourraient se substituer aux oligosaccharides déjà utilisés, font l'objet de ce travail de thèse en vue de leurs éventuelles applications.

Le document est structuré en deux chapitres. Le premier chapitre est consacré à la méthodologie de travail. Il est décrit le choix et la description botanique des espèces végétales à étudier, l'étude des polysaccharides hydrosolubles comprenant l'extraction, la détermination de la composition chimique, l'optimisation des conditions d'hydrolyse et enfin l'analyse qualitative et quantitative des monosaccharides constitutifs de polysaccharides. L'optimisation des conditions d'hydrolyse, est effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM). Les monosaccharides libérés, sont analysés aussi bien par chromatographie échangeuse d'anions haute performance à

détection ampérométrique pulsée (HPAEC- PAD) que par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électronique (GC/MS-EI). Puis, est évaluée *in vitro* l'activité anti-complément des polysaccharides, en déterminant la plus faible concentration capable d'inhiber 50% de l'hémolyse (CI<sub>50</sub>). De même, les effets prébiotiques des différents hydrolysats de polysaccharides, sont testés.

Le deuxième chapitre regroupe les résultats et la discussion. Il porte sur la caractérisation physico-chimique des différentes parties des plantes étudiées. L'analyse des polysaccharides, et les différentes conditions de dépolymérisation mis en œuvre pour l'obtention des monosaccharides et des oligosaccharides d'intérêt biologique potentiel sont discutées. Il est rapporté les résultats de l'étude biologique *in vitro* à savoir l'activité anti-complément.

Une conclusion et des perspectives qui sont un ensemble de réflexions, achèvent ce travail.

*Chapitre I*  
*Méthodologie de travail*

Dans le présent chapitre, il est traité le principe adopté, le matériel utilisé, l'étude de la composition chimique et biochimique de la matière végétale, la caractérisation des polysaccharides isolés et leurs activités biologiques. Chacune des parties, est structurée selon les objectifs recherchés dans ce travail.

### **I.1.- Principe d'étude**

Les polysaccharides sont des bio-macromolécules largement répandues dans les plantes, les microorganismes (champignons et bactéries), les algues et les animaux (YANG et ZHANG, 2009; SHAPIRO, 2013). Ils jouent un rôle important dans la communication cellulaire, la reconnaissance d'adhésion cellulaire et moléculaire.

Les polysaccharides végétaux attirent de plus en plus l'attention, car ils ont diverses activités biologiques. Ils présentent des activités anti-tumorales (LIU *et al.*, 2007), anti-oxydantes (YE *et al.*, 2011), antivirales (TALARICO *et al.*, 2005), anticoagulantes (ATHUKORALA *et al.*, 2006), anti-complément (XU *et al.*, 2007), anti-inflammatoires (WU *et al.*, 2007), antiulcéreuses (YE *et al.*, 2003), hypoglycémiantes (TONG *et al.*, 2008), etc. Ils sont considérés comme des macromolécules importantes pour leurs effets officinaux observés dans différents types de maladies traitées par les herbes utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde. Pour MARLES et FARNSWORTH (1995), ils pourraient jouer un rôle dans la cicatrisation des plaies interne ou externe, et contre les inflammations. WARRAND (2004) rapporte que le lin (*Linum usitatissimum*), est utilisé dans le cas de la constipation ou des troubles fonctionnels du colon. DETERS *et al.* (2010), notent les actions émolliente et calmante (anti-inflammatoire) d'*Althaea rosea*, et l'activité hypoglycémique d'*Hibiscus moscheutos*. Il apparaît que les polysaccharides de différentes plantes médicinales peuvent présenter des activités biologiques d'importance exceptionnelle pour l'humanité dans le futur (GURIB-FAKIM, 2006).

Le présent travail recherche à caractériser les polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien). Il vise les propriétés biologiques dont les activités anti-complément et prébiotique, des polysaccharides issus d'espèces végétales spontanées du Sahara algérien.

## **I.2.- Matériel d'étude**

Le matériel d'étude regroupe les produits, l'appareillage et le matériel biologique.

### **I.2.1.- Produits et appareillage utilisés**

Les solvants et les réactifs utilisés sont indiqués dans le tableau 1. L'origine et le type d'appareils sont présentés dans le tableau 2. Les solutions tampons utilisées dans le test de fixation de complément, sont le tampon véronal de gélatine (YAMADA *et al.*, 1986; DIALLO *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2007 ; XU *et al.*, 2007 ; WANG *et al.*, 2008), le tampon saline au barbital (XI *et al.*, 2012) et le tampon phosphate saline. Le rôle, la composition et la méthode de préparation des solutions utilisées dans la préparation des tampons, sont indiquées dans le tableau 3.

### **I.2.2.- Matériel biologique**

Le matériel biologique regroupe les plantes spontanées, du sang humain, des anticorps (Anti-A et Anti-B) et des souches bactériennes.

Les espèces végétales sont récoltées au Sahara Septentrional Est algérien. Elles sont utilisées en médecine traditionnelle dans la région de Ghardaïa.

Le sang humain est prélevé à partir de volontaires sains de sexe masculin, âgé de 20 à 50 ans selon XI *et al.* 2012, le jour même de son utilisation au laboratoire IBN ROCHD de Ghardaïa (Algérie). L'absence d'antigène HBs, d'anticorps anti-VIH et d'anticorps anti-VHC, est aussi vérifiée. Le groupage sanguin de chacun des individus, est confirmé.

La source des anticorps Anti-A et Anti-B, sont les réactifs de groupage sanguin SPINREACT (SPAIN). Les anticorps utilisés dans la sensibilisation des hématies humaines A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup> sont de type IgM monoclonaux.

Tableau 1.- Caractéristiques physicochimiques et origine des produits chimiques utilisés

Produit	Caractéristiques					
	Forme	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	Densité	Pureté (%)	
Acétone	Liquide	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,08	0,792	100	
Acide acétique	Liquide	CH <sub>3</sub> COOH	60,05	1,048-1,051	99,5	
Acide chloro- hydrique	Liquide	HCl	36,46	1,19	37	
Acide ortho-phosphorique	Liquide	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	98	1,69	85-88	
Acide tri-fluoro-acétique	Liquide	CF <sub>3</sub> COOH	114,02	1,49	99,8	
Aniline	Liquide	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	93,13g	1,02-1,03	98,5	
Azide de sodium	Poudre	NaN <sub>3</sub>	65,01	1,85	99	
Barbital de sodium	Poudre	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>3</sub>	206,147	1,15	98-99	
Butanol	Liquide	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	74,12	0,81	99,9	
Chloroforme	Liquide	CHCl <sub>3</sub>	119,38	1,47	99-99,6	
Chlorure de calcium	Poudre	CaCl <sub>2</sub>	110,98	2,15	99,9	
Chlorure de magnésium	Poudre	MgCl <sub>2</sub>	95,21	2,32	98	
Chlorure de potassium	Poudre	KCl	74,55	1,98	99	
Chlorure de sodium	Poudre	NaCl	58,44	2,16	99,5	
Diphénylamine	Liquide	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N	169,23	1,20	98	
Gélatine	Poudre	/	/	0,68	/	
Hydroxyde de sodium	Poudre	NaOH	39,997	2,13	99	
Méthanol	Liquide	CH <sub>3</sub> OH	32,04	0,79	99,9	
Phosphate de potassium dibasique	Poudre	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	2,338	99	
Phosphate di-sodique di-hydraté	Poudre	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	177,99	1,63	99,5	

Tableau 2.- Origine et types d'appareils utilisés au cours de l'expérimentation

Appareil	Fournisseur	Type	Lieu de fabrication
Agitateur magnétique	VELP CSIENTIFICA	F20520162	EUROPE
Autoclave	WEBECO	WEBECKE. P : 2.5BAR, T :138°C	/
Bain marie	MEMMERT	MEMMERTGMBH. WB 7. NENNTEMP ; 100 °C	GERMANY
Bain marie avec agitation	MEMMERT	MEMMERTGMBH. NENNTEMP;95 °C	GERMANY
Balance	OHAUS	DISCOVERY DV 215CD OHAUS.	USA.
Centrifugeuse	SIGMA	SIGMA. 15PK, 14000 RPM.	GERMANY
Distillateur	LABORTECHNIC	D30-BURGWEDL, 2108	GERMANY
Etuve	MELAG	MELAG815.220V, 50HZ, 12.3A, 2700w.	GERMANY
Hotte	TEL STAR	TELSTAR AV-100. MODELE50/60 HZ, 0.6KW.	SPAIN
Lyophilisateur	CHRIST	CHRIST.ALPHA 1-2LD. 101021.230V, 50HZ, 0.7. KW.	GERMANY
Micropipette	SOCOREX	ACURA 821. 200-1000ML	SWITZERLAND
pH mètre	WTW	WTW.D-82362. PH 1970.	GERMANY
Spectrophotomètre	SHIMADZU	UV-MINI-1240.UV-VIS SPECTROPHOTOMETRE	CHINA
Spectrophotomètre	SHIMADZU	UV Visible type LNICAMYEAR, 2000	JAPAN
Rotat vapor	IKA WERKE	IKA WERKE D-79219, RV06-ML	GERMANY

**Tableau 3.-** Caractéristiques physicochimiques des solutions tampons: préparation et utilisation des solutions de  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{HCl}$  (ALTON *et al.*, 1992; NAHM et BURTON, 2011)

Solution	Concentration	Nature	Etat	Rôle	Méthode de préparation
$\text{CaCl}_2$	0.3M	Saline	Stérile	Source des ions $\text{Ca}^{++}$	Dans une éprouvette graduée de 100 ml, placer 3.7g de $\text{CaCl}_2$ anhydre, compléter le volume par l'eau distillée jusqu'aux 100ml. Après la préparation, cette solution subie à une stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 mm. Conserver cette solution au réfrigérateur.
$\text{HCl}$	1N	Acide	Non stérile	Ajustement de pH	Ajouter 8.33 ml de l' $\text{HCl}$ 12N aux 91.67ml d' $\text{H}_2\text{O}$ .
$\text{HCl}$	6N	Acide	Non stérile	Ajustement de pH	Ajouter 51.5ml de l' $\text{HCl}$ 11.65 mol/l aux 48.5ml d' $\text{H}_2\text{O}$ .
$\text{MgCl}_2$	1N	Saline	Stérile	Source des ions $\text{Mg}^{++}$	Dans une éprouvette graduée de 100ml, placer 9.5g de $\text{MgCl}_2$ anhydre, compléter le volume par l'eau distillée jusqu'aux 100ml. Après la préparation, cette solution subie à une stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20mm. Conserver cette solution au réfrigérateur.
$\text{NaN}_3$	10% (0.1g/ml)	Saline	Non stérile	Agent de conservation antimicrobien	Dans une éprouvette graduée de 10ml, placer 10g de $\text{NaN}_3$ , compléter le volume par l'eau distillée jusqu'aux 100ml.



L'activité prébiotique, est testée sur *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen) Hansen and Lessel ATCC® 334™, souche probiotique du commerce, sous forme lyophilisée et maintenu à -80°C pour un stockage de longue durée.

### I.2.2.1.- Choix des plantes

Dans les zones tropicales et subtropicales, il existe des plantes succulentes et non-succulentes qui abritent des mucilages dans leurs tissus, à la surface de leurs graines ou dans leurs téguments. Ces mucilages peuvent avoir diverses utilisations pratiques. Ils sont utilisés comme agent thérapeutique en médecine traditionnelle ou en médecine conventionnelle. Ils ont tous en commun soit un effet bénéfique sur les brûlures, les plaies, les ulcères, les inflammations internes et externes, les irritations, la diarrhée et la dysenterie, etc. (KATAYAMA *et al.*, 2008).

Le Sahara septentrional Est algérien possède une végétation diffuse et clairsemée. L'état de la flore spontanée dans cette zone ainsi que les relations entre l'homme et les espèces végétales, méritent une attention particulière. Certaines espèces possèdent des propriétés pharmacologiques qui leur confèrent un intérêt médicinal. Les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales ont été pendant longtemps le principal, voir l'unique recours de la tradition orale pour soigner les pathologies, en même temps que la matière première pour la médecine moderne (OULD EL HADJ *et al.*, 2003). GRAYER *et al.* (1999), notent que les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et/ou qui poussent dans les mêmes biotopes, sont susceptibles de synthétiser les mêmes groupes de molécules chimiques.

Le choix de telle ou telle partie à traiter de la plante dépend de l'espèce de la plante utilisée et parfois de l'effet escompté. Généralement, les polysaccharides des plantes sont concentrés dans des parties spécifiques, dans les graines, et dans les organes souterrains. Le choix de la plante, est basé sur des données ethnopharmacologiques indiquant, son utilisation contre certaines maladies inflammatoires. A la recherche de nouvelles polysaccharides et leurs activités biologiques, quatre espèces végétales spontanées à caractère médicinal du Sahara septentrional Est algérien, sont retenues. Il s'agit de deux espèces de la famille des Lilliaceae à savoir *Asphodelus tenuifolius* (Cavan.) et *Urginea*

*noctiflora* (Batt et Trab.), une espèce de la famille des Fabaceae (*Astragalus armatus* Lam.) et une espèce de la famille des Plantaginaceae (*Plantago notata* Lagasca).

La famille des Liliaceae est l'une des plus grandes familles des angiospermes en nombre d'espèces végétales. Les espèces de cette famille botanique représentent 4,6% des plantes médicinales. Le choix des espèces appartenant aux Liliaceae, se justifie car la paroi des bulbes et les graines des espèces de cette famille, sont constituées de polysaccharides acides, de protéines, de lipides insaturés et de composés phénoliques (CLEMENT et AUDRAN, 1993). De même, les études chimiotaxonomiques de la famille montrent leur richesse en alcaloïdes comme galanthamine, jervine et colchicine. La colchicine a une utilisation répandue dans la médecine et dans la biologie moléculaire (LARSSON, 2007). Les Liliaceae sont caractérisés par des anthocyanines avec les groupements aromatiques et aliphatiques d'acyle et des anthraquinones qui sont des quinones spécifiques à cette famille botanique (HARBORNE et WILLIAMS, 1994).

Un nombre considérable des plantes de la famille des Fabaceae forment des sources appréciables de mucilage. A titre d'exemple, est utilisée comme adoucissants dans la pratique médicale, la gomme adragante (tragacathe ou gomme de dragon) qui est un exsudat obtenu à partir de la sève mucilagineuse séchée d'une vingtaine d'espèces de plantes du genre *Astragalus* (MORTON, 1990).

Les espèces de la famille des Plantaginaceae, sont utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde (SAMUELSEN, 2000). Certains ont été largement étudiées, comme *Plantago afra*, *Plantago psyllium*, *Plantago ovata* (isabgul), *Plantago indica* et *Plantago major*. Les polysaccharides de quelques espèces de la famille des Plantaginaceae attirent de plus en plus l'attention en raison de leurs effets anti-spasmodiques (FLEER et VERSPOHL, 2007), anti-complémentaires (SAMUELSEN *et al.*, 1999b), hypoglycémiant (HANNAN *et al.*, 2006), antioxydants (YE *et al.*, 2011) ou stimulant de l'activité de l'oxyde nitrique; facteur de nécrose tumorale (HU *et al.*, 2013b).

#### **I.2.2.1.1.-*Asphodelus tenuifolius***

*Asphodelus tenuifolius* est communément appelé en Algérie « Tazia » (OULD EL HADJ *et al.*, 2003). C'est une plante annuelle herbacée monocotylédone de 10 à 30 cm. Elle est non

visqueuse. Les feuilles sont cylindriques, creuses, de couleur vert vif, prenant naissance à la base, avec les hampes courtes. Les fleurs sont blanches à pédoncule non recourbé après la floraison. Les graines plissées sont à trois angles (OZENDA, 2004) (photo 1). La plante est utilisée en tisane, en poudre, ou en pommade pour les traitements des fièvres, des indigestions, des constipations et des lésions cutanées (HAMMICHE et MAIZA, 2006).

#### **I.2.2.1.1.1.- Position systématique**

Embranchement : Spermaphyte  
Sous embranchement : Angiosperme  
Classe : Monocotylédones  
Ordre. : Asparagales  
Famille : Lilliaceae  
Genre : *Asphodelus*  
Espèce : *Asphodelus tenuifolius* (Cavan.) (OZENDA, 2004)

#### **I.2.2.1.1.2.- Répartition géographique**

*Asphodelus tenuifolius* est une espèce assez commune dans tout le Sahara (OZENDA, 2004). Cette plante est originaire d'Afrique du Nord, du Sud Ouest de l'Europe, de la péninsule arabique, de l'Asie du Sud, du Pakistan et de l'Inde (FREIJE *et al.*, 2013).

#### **I.2.2.1.1.3.- Etudes ethnopharmacologiques et phytochimiques**

La poudre issue des graines d'*Asphodelus tenuifolius* s'utilise par les populations de Thari (Nara Desert, Pakistan) contre les hémorroïdes (QURESHI et BHATTI, 2008). *A. tenuifolius*, utilisé dans la médecine traditionnelle du Soudan comme diurétique. L'extrait chloroformique et méthanolique de la partie aérienne d'*A. tenuifolius*, ont une large activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (ELEGAMI *et al.*, 2001).

*Asphodelus tenuifolius* est une plante spontanée très utilisée dans la médecine traditionnelle par la population de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien)



**Photo 1.-** *Asphodelus tenuifolius* Cavan. (Liliaceae) au stade floraison (Oued Nechou, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est algérien)

La population autochtone du désert de Cholistan au Pakistan utilise l'*Asphodelus tenuifolius* pour la prévention des problèmes d'athérosclérose et comme diurétique. Ses constituants chimiques comprennent anthraquinones, des flavonoïdes, des stéroïdes et triterpènes. SAFDER *et al.*, (2012) ont isolé deux nouveaux triterpène glycosidiques, Asphorins A et B avec un nouveau isomère de coumarine, chromone, à partir de la sous fraction d'acétate éthylique de l'extrait méthanolique brute de la plante complète. JABEEN *et al.*, (2009) signalent que *Asphodelus tenuifolius* est une plante médicinale a usage externe pour traiter les ulcères et les inflammations. Les graines ont un effet diurétique. Le décocté des feuilles est recommandé dans le calcul rénal tandis que le cataplasme des feuilles, est appliqué sur les œdèmes. Les graines ont un effet diurétique et sont appliquées par voie externe contre les ulcères et les inflammations. La plante est réputée antihypertensive (MAHMOOD *et al.*, 2011).

#### **I.2.2.1.2.- *Urginea noctiflora***

*Urginea noctiflora* est connu en Algérie sous le nom «Becis el far» (TRABUT, 1935). *Drimia noctiflora* (Batt. & Trab.), est signalé comme synonyme (photo 2). Elle porte les noms de Tiouag, bessis elfar, ou encore bessis edib (TRABUT, 1935). Elle a des feuilles étroites, un peu charnues, enroulées en tire-bouchon. La hampe florale est de 20 à 40 cm; comporte 4 à 10 fleurs gris-rose, penchées qui s'ouvrent la nuit en recourbant leurs pétales en arrière (OZENDA, 2004). C'est une plante bulbeuse à bulbe tuniquee; de 4 à 6cm de longue; à tuniques blanchâtres et à racines sortant toutes de la base et charnues (QUEZEL et SANTA, 1962).

##### **I.2.2.1.2.1.- Position systématique**

Embranchement : Spermaphyte

Sous embranchement : Angiosperme





**Photo 2.-** *Urginea noctiflora* Batt et Trab. (Liliaceae) (Oued lachebour, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est algérien')

Classe	: Monocotylédones
Ordre	: Asparagales
Famille	: Lilliaceae
Genre	: <i>Urginea</i>
Espèce	: <i>Urginea noctiflora</i> (Batt et Trab.) (OZENDA, 2004)

#### **I.2.2.1.2.2.- Répartition géographique**

*Urginea noctiflora* est une espèce endémique du Sahara septentrional. Sa distribution est commune au Sahara septentrional, dans le Sud marocain et oranais, le Tademaït et sur les hamadas (OZENDA, 2004).

#### **I.2.2.1.2.3.-Etudes ethnopharmacologiques et phytochimiques**

En Turquie, les herboristes utilisent les bulbes d'*Urginea maritime* dans le traitement des blessures, des hémorroïdes, des dermatites, des problèmes cardiaques, de pneumonie, des toux, des bronchites chroniques, d'asthme, de morsures abortives de vipères, d'ictère, de certaines tumeurs, comme aphrodisiaque, diurétique, et purgatif. Il contient 1 à 3% de glycosides cardiaques, des anthocyanines, des acides gras, des flavonoïdes et des polysaccharides (SHARAF *et al.*, 2006).

En compresse ou en poudre, les bulbes d'*U. noctiflora*, sont préconisées pour le traitement des plaies et des maux d'oreilles dans le Sahara septentrional Est algérien (OULD EL HADJ *et al.*, 2003).

#### **I.2.2.1.3.-*Astragalus armatus* (Lam.)**

*Astragalus armatus* est connu en Algérie sous le nom «El guendoul» (TRABUT, 1935). C'est un arbrisseau de 80cm de hauteur, à épines blanchâtres (photo 3). Les pétioles sont durs et aigus (OZENDA, 2004). Les feuilles forment d'abord un bouquet serré puis elles s'éloignent de la tige, en séchant les folioles tombent. Il ne reste plus qu'une longue épine. Les fleurs sont blanches et nombreuses tout autour de la tige. Le calice est poilu et renflé.



**Photo 3.-** *Astragalus armatus* (Lam.) (Fabaceae) (Oued Laadira, région de Ghardaïa, Sahara septentrional Est algérien)



Il contient le fruit. Les gousses sont uniloculaires, demeurent enfermées dans le calice fortement accrescent, à parois parcheminées, glabres réticulées (QUEZEL et SANTA, 1962).

#### **I.2.2.1.3.1.- Position systématique**

Embranchement	: Spermaphyte
Sous embranchement	: Angiosperme
Classe	: Dicotylédones
Ordre	: Rosales
Famille	: Fabaceae
Genre	: Astragalus
Espèce	: <i>Astragalus armatus</i> (Lam.)(OZENDA, 2004)

#### **I.2.2.1.3.2.- Répartition géographique**

*Astragalus armatus* se présente en colonies dans la zone prédésertique du Sahara septentrional (QUEZEL et SANTA, 1962). Dans les pays du bassin méditerranéen cinq cents espèces, ont été décrites dont une cinquantaine en Afrique du Nord (RAYNAUD, 1982; JOHANDIEZ et MAIRE, 1932). Au Sahara algéro-marocain, une quinzaine d'espèces sont identifiées (OZENDA, 2004). La croissance des espèces du genre *Astragalus*, se produit de l'automne au printemps. Les feuilles demeurent vertes pendant l'hiver quand l'herbe est peu disponible. Chez certaines espèces, les graines peuvent maintenir leur vitalité pendant quarante ans (JAMES *et al.*, 1981; NIELSON, 1978).

#### **I.2.2.1.3.3.- Etudes ethnopharmacologiques et phytochimiques**

Les espèces du genre *Astragalus* semble uniforme dans la composition chimique, avec deux types de principes bioactifs, les polysaccharides et les saponines, et trois types différents de composés toxiques, les alcaloïdes à noyau indolizidine, les dérivés nitrés et 3 glucosides de nitropropyl, et les composés de Sélénium. Des polysaccharides d'*Astragalus* spp sont connus pour leurs propriétés anticancéreuses et immunomodulatrices. Les études chimiques de POLAT *et al.*(2009), sur des saponines d'*Astragalus* sp, révèlent la présence de

cycloartane-type glycosides de triterpénoïde ayant des activités anti-inflammatoires, analgésiques, diurétiques, hypotendus et sédatifs.

Les espèces du genre *Astragalus*, sont importantes pour la production de gomme adragante, un aliment très connu et un émulsifiant pharmaceutique. Dans la médecine traditionnelle turque, les extraits aqueux de quelques espèces d'*Astragalus*, sont employés pour traiter la leucémie aussi bien que pour la cicatrisation des blessures (CALIS *et al.*, 2008).

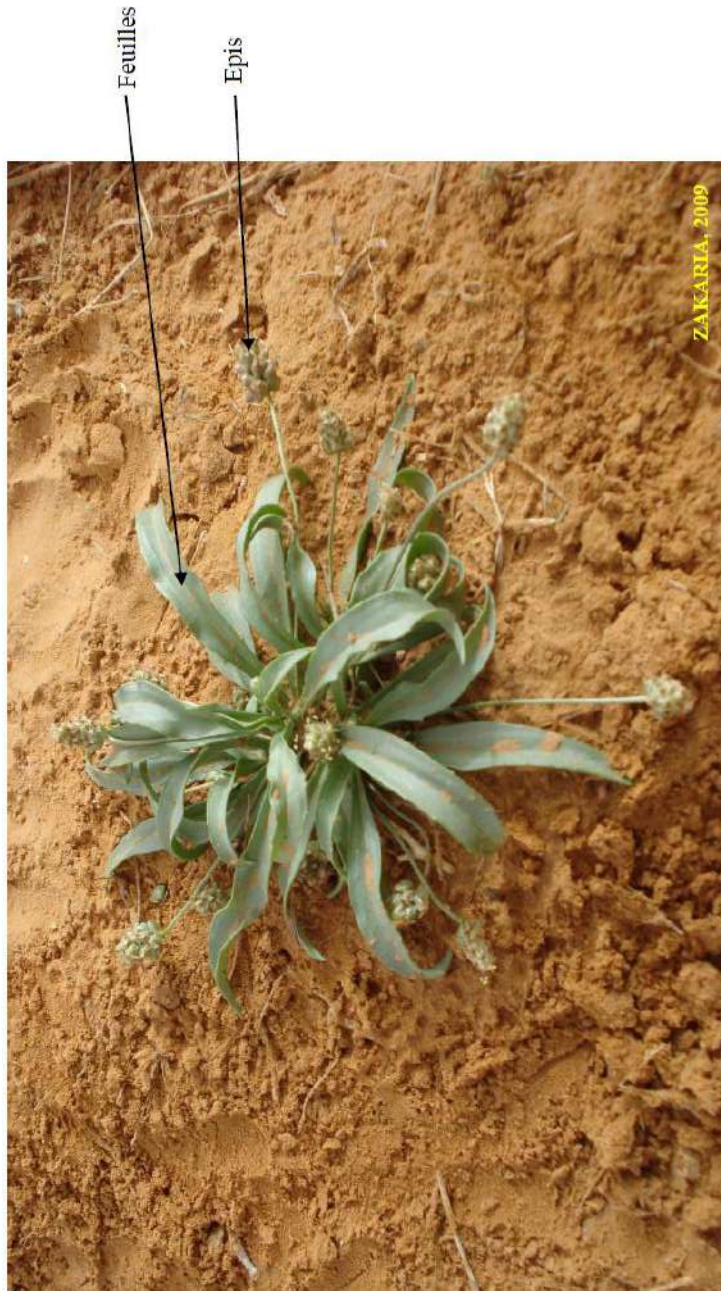
Treize polysaccharides isolés des parties aériennes d'*Astragalus mongholicus* Bunge, ont une activité immunomodulatrice contre les cellules immunocompétentes des plaques de Peyer (KIYOHARA *et al.*, 2010).

#### **I.2.2.1.4.-*Plantago notata* Lagasca**

*Plantago notata* est connu en Algérie sous le nom «Linim» (TRABUT, 1935; QUEZEL ET SANTA, 1963). Aussi appelé plantain, nom commun appliqué à une série d'herbes omniprésentes du genre *Plantago* qui appartient à la famille des Plantaginaceae (photo 4). Plante herbacée de petite taille, ne dépassant pas 15cm de long. Les feuilles sont étroites, velues, très allongées et étalées sur le sol. Les nervures principales sont parallèles, à pétiole peu distinct. Les fleurs blanches, sont groupées en épis à l'extrémité des hampes dépourvues de feuilles. La bractée et les sépales à longs poils, donnent à l'épi un aspect laineux. Les sépales sont sous nervures (OZENDA, 2004). Or le plantain, comme le Rumex, sont une des plantes qui signalent en paléobotanique l'anthropisation d'une région. Le nom *Plantago* lui-même est issu du latin *planta*, la plante des pieds, que rappelle la forme de la feuille. Le nom allemand «Wegerich» du vieil allemand *weg* + *rih* (= roi) signifie que la plante «domine le chemin» (GHEDIRA *et al.*, 2008).

##### **I.2.2.1.4.1.- Position systématique**

Embranchement : Spermaphyte  
Sous embranchement : Angiosperme  
Classe : Dicotylédones



**Photo 4.-** *Plantago notata* (Lagasca) (Plantaginaceae) (Oued Nechou, région de Girardaia, Sahara septentrional Est algérien)

Ordre	: Lamiales
Famille	: Plantaginaceae
Genre	: Plantago
Espèce	: <i>Plantago notata</i> (Lagasca) (OZENDA, 2004)

#### **I.2.2.1.4.2.- Répartition géographique**

*Plantago notata* (Lagasca), moins répandu par rapport aux autres espèces du même genre, elle se présente au Sahara septentrional (Biskra, M'Zab) (OZENDA, 2004). Elle est aussi signalée en Espagne, en Afrique du Nord, au Sud-Est asiatique et en Iran. *Plantago notata* est une espèce de zone disjointe entre les zones orientale et occidentale du bassin méditerranéen (QUEZEL et SANTA, 1963).

#### **I.2.2.1.4.3.- Etudes ethnopharmacologiques et phytochimiques**

La poudre des feuilles et des graines de *Plantago notata* sont employées comme cicatrisantes des blessures, pour les traitements des inflammations de gorge et des ulcères. Elles sont utilisées en macération pour le traitement des constipations (VOISIN, 1987). En dépit de son utilisation traditionnelle dans diverses conditions inflammatoires, il n'y a aucune étude scientifique sur ses propriétés anti-inflammatoires.

Les espèces du genre *Plantago*, sont cultivées pour leurs divers usages médicaux et économiques. Les graines de *Plantago ovata*, de *Plantago psyllium*, et de *Plantago major* sont indiquées comme laxatifs. Les téguments des graines de *Plantago ovata* et de la gomme d'*Acacia* peuvent être employés en tant que stabilisateur des crèmes glacées. *Plantago lanceolata* et *Plantago major*, sont utilisés comme remède antirhumatismal externe dans la médecine traditionnelle en Italie (PRAMANIK et SEN RAYCHAUDHURI, 1997).

#### **I.2.2.2.- Technique de récolte et de séchage du matériel végétal**

Après le choix des stations de récolte basé sur les facteurs écologiques les plus discriminants de la végétation, notamment la géomorphologie et le sol, des relevés phytoécologiques sont effectués sur l'ensemble de l'aire de répartition des plantes

spontanées dans la région (OMS, 2003). Pour une bonne réussite de l'échantillonnage, la saison où le développement et la diversité floristique sont maxima, notamment pour les espèces annuelles, est retenue. La floraison des espèces pérennes facilite leur identification (OZENDA, 2004).

Les espèces végétales retenues pour la présente étude, sont récoltées dans leur biotope d'existence naturelle loin des endroits anthropisés dans le but d'éviter toute action de l'homme. Elles sont récoltées dans différents oueds de la région de Ghardaïa entre les mois de Février et Avril de 2009, 2010 à 2011.

*Asphodelus tenuifolius* est récolté à l'oued Akhelkhel; *Urginea noctiflora* à l'oued Lachebour, alors que *Astragalus armatus*, à l'oued Laadira et *Plantago notata* à l'oued Nechou.

Les différentes parties utilisées pour chaque espèce végétale, sont les parties aériennes pour *Asphodelus tenuifolius*, les graines de *Plantago notata* et d'*Astragalus armatus* et les bulbes d'*Urginea noctiflora*.

Les parties aériennes (feuilles et graines) d'*Asphodelus tenuifolius*, une fois séparée des racines, sont séchées à l'abri de la lumière à l'air libre, à la température ambiante (DIALLO *et al.*, 2004); durant trois semaines. Les parties aériennes ainsi séchées, sont conservées dans des boîtes à sec, à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse.

Pour *Urginea noctiflora*, ce sont les bulbes saines qui sont retenues et débarrassées de leurs pellicules sèches, des racines et du collet. Les bulbes parées, sont lavées à l'eau pour les débarrasser de toutes les impuretés (terre, fragments de pellicules sèches) qui y adhèrent. Pour accélérer le séchage, les bulbes sont hachés et étalés en couche mince sur les surfaces de séchage et retournés quotidiennement. Après séchage, les fragments découpés présentent un aspect craquant. Ils sont conservés dans des bouteilles en verre à sec, à l'abri de la lumière (DOASSEM, 2002).

Des gousses d'*Astragalus armatus* saines et mûres, sont récoltées et décortiquées pour obtenir les graines. Les graines conservées dans des sachets en papier dans un endroit frais et sec à l'abri de la lumière, à la température ambiante (OMS, 2003).

### **I.3.- Analyses physico-chimiques et biochimiques**

Les analyses portent sur des réactions de coloration, le taux de protéines, les oses constitutifs, les lipides, les fibres, ainsi que sur la détermination de la teneur en cendres. Les analyses sont répétées trois fois supplémentaires.

#### **I.3.1.- Dosage des cendres**

La teneur en cendres est déterminée par séchage de la matière végétale (2,5mg de l'échantillon homogène) dans l'étuve à 105°C à sec, suivi par une calcination au four à moufle à une température de 525°C±25°C, jusqu'à l'apparition d'une coloration blanche ou grise (BARKHATOV et ELISSEV, 1979 ; AUDIGIE, 1984). Le pourcentage en cendres est exprimé selon la formule (AUDIGIE, 1984):

$$\text{Cendres (\%)} = [(M_2 - M_0) / (M_1 - M_0)] \times 100$$

M<sub>0</sub>: poids de creuset vide (g),

M<sub>1</sub>: poids (creuset+échantillon) avant incinération (g),

M<sub>2</sub>: poids (creuset+cendres) après incinération (g).

#### **I.3.2.- Dosage des éléments minéraux**

Le dosage des éléments minéraux tels que le calcium, le magnésium, le potassium et le sodium, s'effectue par spectrophotométrie d'absorption atomique bifaisceau de type Shimadzu AA 6800 (PERE, 1999).

Les cendres sont diluées dans 2,5ml d'acide chlorhydrique (0,5N) et complétée à 5 ml avec l'eau bidistillée (BANGOOD, 1984). Ces solutions sont dosées à la spectrophotométrie d'absorption atomique.

#### **I.3.3.- Dosages des oses totaux**

Le dosage des oses totaux est effectué selon la méthode de DUBOIS *et al.* (1956). En milieu acide concentré, les glucides se transforment en dérivés furfuraux qui en se

complexant avec le phénol, donnent des composés de couleur orange, leur densité optique (DO), est lue à la longueur d'onde 490 nm, au spectrophotomètre UV visible type LNICAMYEAR, 2000(WARRANT, 2004).

#### **I.3.4.- Dosage des protéines**

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de BRADFORD (1976). La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie par interactions non covalentes avec les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines (AUTRAN, 1991).

Une quantité de 1600µl de l'étalon ou de l'échantillon, est placée dans un tube approprié. Il est ajouté 400µl de réactif de Coomassie et homogénéisé pendant 30 secondes. Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est mesurée à 595 nm par un spectrophotomètre UV de type LNICAMYEAR, 2000. Il est soustrait le blanc (où l'échantillon est remplacé par 1600µl d'eau distillée) de la lecture. La courbe d'étalonnage est tracée en fonction de la concentration en sérum albumine bovine (µg/ ml).

#### **I.3.5.- Dosage des lipides**

Les lipides sont des substances naturelles constituants des structures cellulaires tels que les phospholipides membranaires, les éléments de revêtement (cires, cutines, etc.), les substances de réserve, les sources d'énergie cellulaire.

Afin d'extraire et de déterminer la teneur en matières grasses des échantillons (5g d'échantillon), il est utilisé la méthode AFNOR(1984). Elle est basée sur l'extraction solide-liquide par soxhlet, en utilisant l'éther de pétrole comme phase liquide (BOUDHIOUA *et al.*, 2008).

#### **I.3.6.-Dosage des fibres brutes**

La teneur en fibres brutes, est déterminée par l'appareil Raw Fiber Extractor (Velp Scientifica), selon la méthode de WEENDE (VAN SOEST et ROBERTSON, 1979). Cette

méthode se basée sur la solubilisation des composés non-cellulosiques dans des solutions d'acide sulfurique et d'hydroxyde de potassium. Le mode opératoire repose sur:

- La détermination de l'humidité de l'échantillon par chauffage à 105°C jusqu'à poids constant dans un four, refroidir dans un dessiccateur;
- Peser séparément environ 1g d'échantillon broyé;
- Ajouter de l'acide sulfurique à 1,25% jusqu'au repère de 150ml, après préchauffage à l'aide de plaque chauffante;
- Ajouter 3 à 5 gouttes de n-octanol comme agent anti-moussant;
- Faire bouillir pendant 30mn à partir du début de l'ébullition;
- Brancher le vide pour vidanger l'acide sulfurique;
- Laver trois fois avec 30ml (creuset rempli jusqu'en haut) d'eau distillée chaude, en connectant à chaque fois l'air comprimé pour mélanger le contenu des creusets;
- Après avoir vidangé le dernier lavage, ajouter 150 ml d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1,25% préchauffé et 3 à 5 gouttes d'agent anti-moussant;
- Faire bouillir 30 mn;
- Filtrer et laver avec 30 ml d'eau distillée chaude;
- Effectuer un dernier lavage avec de l'eau distillée froide, puis laver trois fois le contenu des creusets avec 25 ml d'acétone, en mélangeant chaque fois à l'aide d'air comprimé;
- Retirer les creusets et déterminer le poids sec après séchage dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant;
- Laisser refroidir dans un dessiccateur.
- Le poids obtenu représente les fibres brutes plus la teneur en cendres en comparaison du poids initial.
- La différence de poids en comparaison avec l'étape précédente représente le contenu en fibre brute sans les cendres.

### **I.3.7.- Extraction des composés phénoliques**

La méthode d'extraction consiste à faire macérer 10g de poudre végétale dans une série de solvants de polarité croissante: hexane, chloroforme (de polarités faibles, utilisés pour l'extraction des composés apolaires), acétate d'éthyle (de polarité moyenne, utilisé pour l'extraction des composés de polarité modérée) et éthanol (de polarité élevée, utilisé pour l'extraction des composés polaires tels que les flavonoïdes hétérosidiques). Les extractions



sont répétées trois fois. Les extraits sont ensuite combinés (fig.1). Après filtration, les extraits organiques subissent une évaporation sous vide par un rotor vapor (IKA WERKE D-79219) à une température de 40°C. Les extraits sont pesés pour déterminer les rendements (DIALLO *et al.*, 2004).

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule:

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = (G - G_1 / g) \times 100$$

G: Poids du ballon plein en gramme,

G<sub>1</sub>: Poids du ballon vide en gramme,

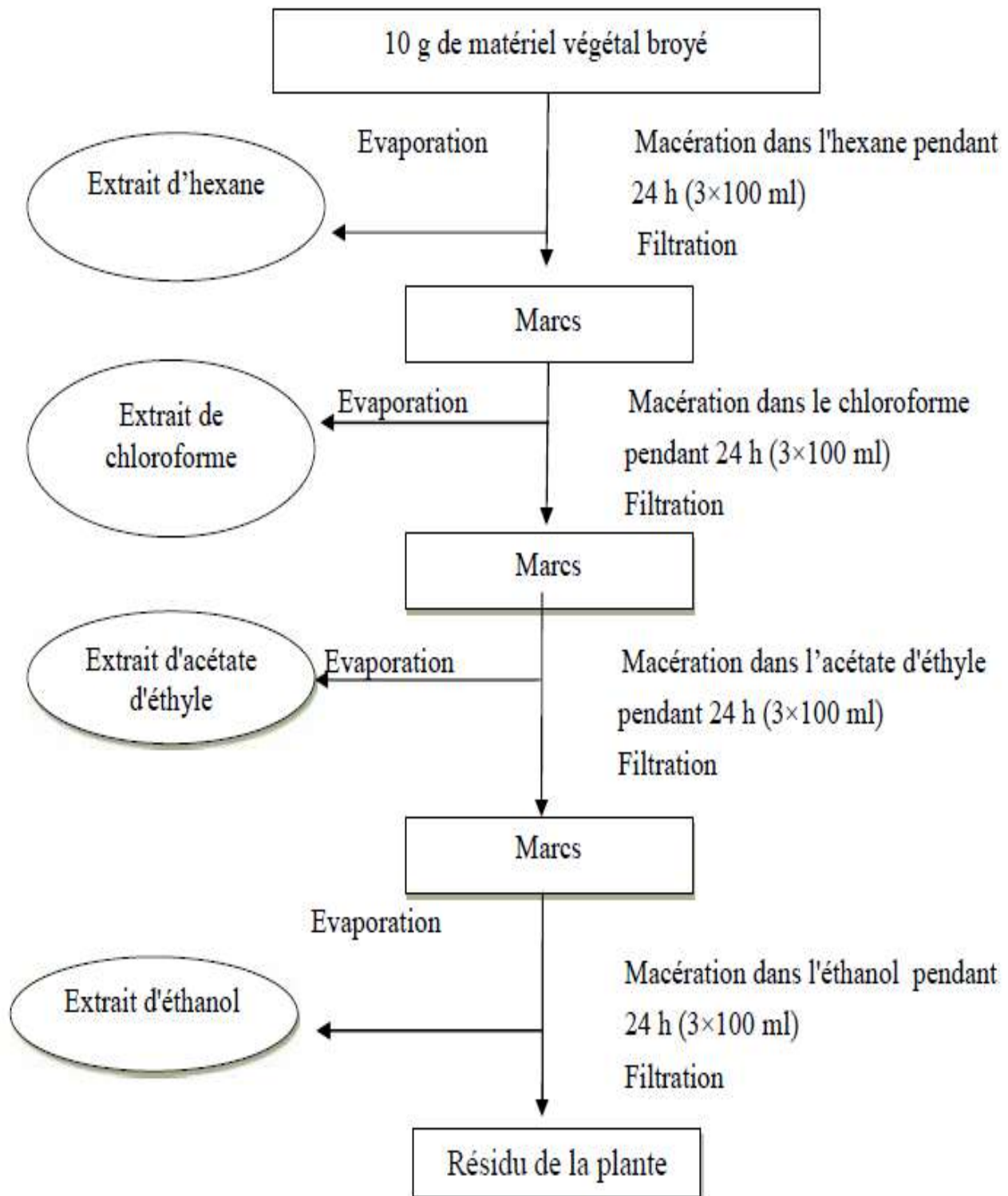
g: Poids de la prise d'essai en gramme.

### **I.3.7.1.- Dosage des composés polyphénoliques totaux (PPT)**

Les composés phénoliques, sont estimés par la méthode de Folin ciocalteu (ADESEGUN *et al.*, 2010). Cette méthode est utilisée pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et des aliments (ABDEL-HAMEED, 2009). Il est additionné à 1 ml d'extrait dilué à l'eau distillée (1:10), 1ml du réactif de Folin Ciocalteu. Après 10 minutes, une quantité de 500µl de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 20% (m/v), est ajoutée. Le mélange obtenu est incubé à la température ambiante pendant environ 40mn à l'abri de la lumière. L'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 725nm contre une solution de méthanol utilisé comme blanc. Notons qu'une droite d'étalonnage, est préalablement réalisée avant l'analyse avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Les résultats obtenus, sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g) (MUANDA, 2010). Les analyses sont répétées trois fois supplémentaires.

### **I.3.7.2.- Dosage des flavonoïdes totaux (FVT)**

Le dosage des flavonoïdes s'effectue par la méthode de LAMAISON et CARNET (1990) et HUANG *et al.* (2004), en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) comme réactif.



**Figure1.-** Différentes étapes de l'extraction desphénols totaux par macération (DIALLO *et al.*, 2004)

1ml de chaque extrait, préparé dans le méthanol a été ajouté à un volume égal d'une solution de 2% de  $AlCl_3$ . Le mélange est agité, et l'absorbance est lue à 367 nm après 10 minutes d'incubation. La concentration en flavonoïdes, est déduite à partir de gammes d'étalon établies avec la rutine (0-35 $\mu$ g/ml), et exprimée en milligramme d'équivalent de la rutine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g).

### **I.3.7.3.- Activité antioxydante totale**

L'activité antioxydante totale des extraits d'hexane, de chloroforme, d'acétate d'éthyle, et d'éthanol des espèces végétales étudiées, est évaluée par la méthode de PRIETO *et al.* (1999). Le pouvoir antioxydant est mesuré par spectrophotomètre en utilisant la méthode de phosphomolybdate, basée sur la réduction de phosphomolybdate ( $Mo^{6+}$ ) au ( $Mo^{5+}$ ) par les antioxydants présents dans les extraits. 100ml d'un mélange de trois solutions (0,6M acide sulfurique, 28mM phosphate sodium et 4M molybdate ammonium), sont préparés. 200 $\mu$ l de chaque extrait dilué, sont ajoutés 2ml de la solution de phosphomolybdate préparée. Le mélange est placé dans un bain marie à une température de 95°C pendant 90mn, après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme référence pour établir une courbe d'étalonnage. L'activité antioxydante est exprimée en mg équivalent en acide ascorbique (AE)/g d'échantillon.

### **I.4.- Etude des polysaccharides**

L'étude porte sur l'extraction des polysaccharides, la précipitation des protéines, la composition globale des extraits de polysaccharides hydrosolubles et enfin le dosage et l'identification des résidus glycosidiques.

L'analyse structurale d'un polymère comprend plusieurs étapes: l'extraction, la purification, la détermination de la composition centésimale et molaire en monosaccharides, puis l'étude de la séquence en monosaccharides, la nature de leurs points de liaisons, leur anomérisation et leur conformation. Les difficultés liées à l'analyse des polysaccharides, sont généralement dues aux faibles quantités de matières extraites, mais également au choix des méthodes de séquençage et de leurs combinaisons (RUIZ, 2005).

#### **I.4.1.- Extraction des polysaccharides des feuilles**

La partie aérienne d'*A. tenuifolius* séchée et écrasée, est prétraitée par de l'éthanol 75% pendant 5 heures (DIALLO *et al.*, 2003), à la température ambiante et sous agitation douce; puis filtrées afin d'éliminer les composés solubles dans l'éthanol, tels que les polyphénols, les oligosaccharides, les oses simples et les acides aminés (WU *et al.*, 2007). Le résidu des feuilles prétraitées, est séché une seconde fois à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante pendant 48 heures (DIALLO *et al.*, 2003). Les feuilles ainsi séchées, sont macérées dans 2 volumes d'eau distillée froide, pendant 24 heures à la température ambiante. Le mélange est filtré à travers un tamis de porosité 100 µm. Le filtrat est concentré à 60°C jusqu'à l'obtention du 1/3 du volume initial, dans le rotor vapor type IKA WERKE D-79219 (EBRINGEROVA *et al.*, 2003). Les protéines sont éliminées et précipitées par de l'acide trichloroacétique (RAJALINGAM *et al.*, 2009). Les polysaccharides du concentrât, sont précipitées à l'aide de 3 volumes d'éthanol 75% pendant 24 heures à une température de 4°C (EBRINGEROVA *et al.*, 2003). Après centrifugation à 3560g pendant 10mn (EBRINGEROVA *et al.*, 2003 ; SEPULVEDA *et al.*, 2007), le culot est récupéré puis lavé 3 fois par éthanol 75% (EBRINGEROVA *et al.*, 2003), avant d'être séché par lyophilisation (BIRINGANINE *et al.*, 2004) (fig. 2).

#### **I.4.2.- Extraction des polysaccharides des graines et de bulbes**

Les graines sèches d'*A. armatus* et de *P. notata*, et les bulbes secs d'*U. noctiflora* sont broyés pour obtenir de poudres fines (fig. 3). Elles serviront pour la préparation des extraits (IBANEZ et FERRERO, 2003). 10g de poudre, sont prétraités par 50 ml de l'éther de pétrole pendant 24 heures (ZHU *et al.*, 2014), à la température ambiante et sous agitation douce; puis filtrées afin d'éliminer la matière grasse. La poudre prétraitée, est séchée une seconde fois à l'abri de la lumière, dispersés dans 100 ml d'eau distillée chaude à 80°C dans un Earlen Mayer, pendant 2 heures sous agitation constante. L'extrait forme un gel très visqueux (GUO *et al.*, 2007 ; SAMUELSEN *et al.*, 1999a). Après centrifugation à 6000g pendant 20 mn, le gel est séparé (WANG *et al.*, 2009). Le culot est récupéré et séché à l'air puis extrait deux fois avec de l'eau à 80°C pendant 2 heures (NERGARD *et al.*, 2004). Les surnageants sont réunis et concentrés à 60°C et à 72 mbar jusqu'à l'obtention du 1/3 du volume initial, dans le rotor vapor de type IKA WERKE D-79219 (GUO *et al.*, 2007). Les

protéines sont éliminées et précipitées par l'acide trichloroacétique (RAJALINGAM *et al.*, 2009). Les polysaccharides du concentrât, sont précipitées à l'aide de 3 volumes isopropanol à 95% pendant 24 heures à une température de 4°C (IBANEZ et FERRERO, 2003). Après centrifugation à 4000xg pendant 10 mn (EBRINGEROVA *et al.*, 2003; SEPULVEDA *et al.*, 2007), le culot est récupéré puis lavé 3 fois à l'acétone et dissout dans l'eau distillée (WU *et al.*, 2007), avant d'être lyophilisé (BIRINGANINE *et al.*, 2004).

### **I.4.3.- Précipitation des protéines**

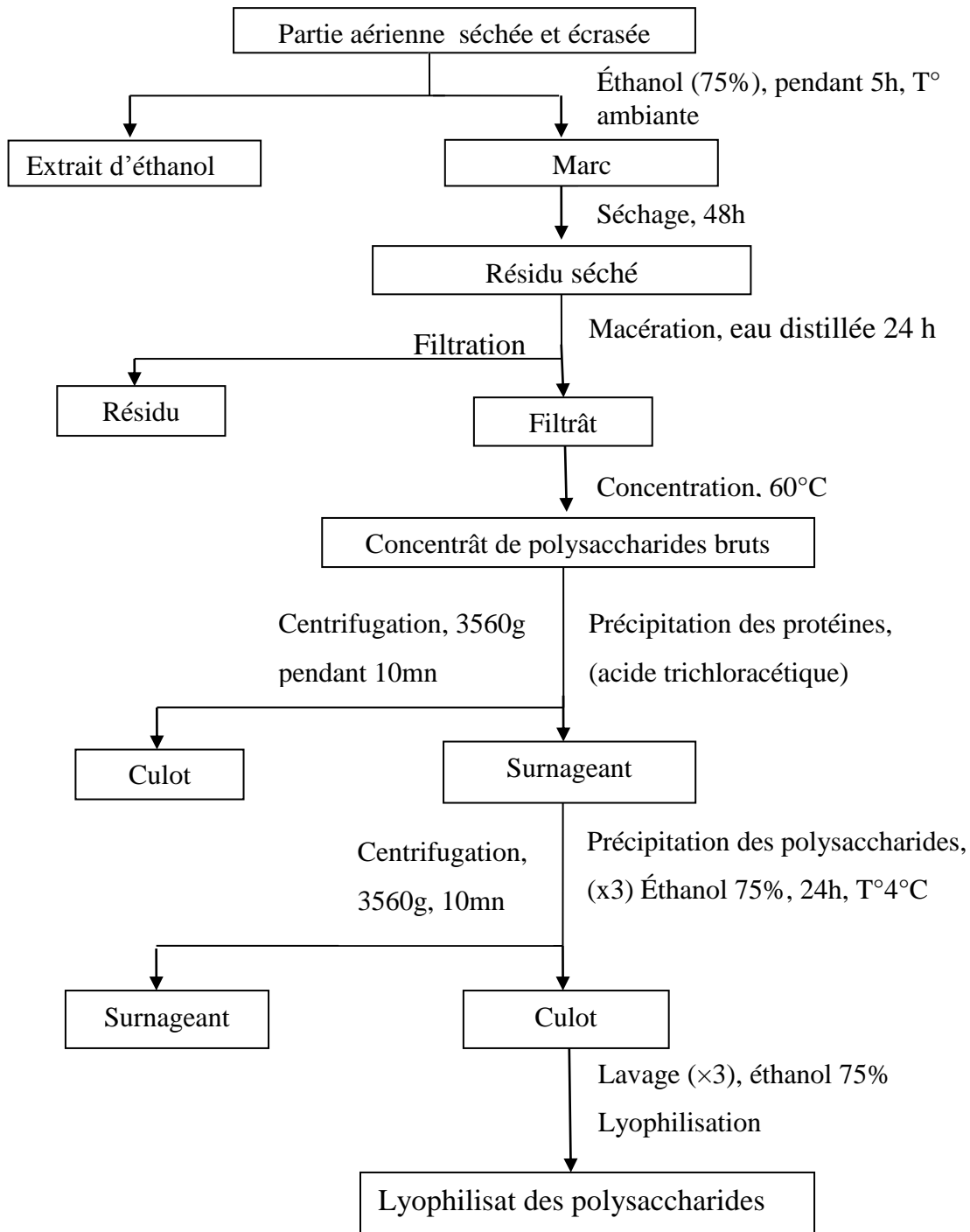
Les protéines des extraits polysaccharidiques, sont précipitées par l'acide trichloracétique, suivant la méthode de SAGAR et PANDIT(1983) modifiée par RAJALINGAM *et al.* (2009). Pour optimiser l'efficacité de la précipitation, l'acide trichloracétique est ajouté en concentration progressive 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2, 5, 10, et 20%. Après 24 heures à 4°C, la solution est centrifugée à 4000xg pendant 15mn. Le surnageant est récupéré pour le dosage des oses totaux par la méthode de DUBOIS *et al.* (1956) par référence à une gamme étalon de glucose. Les protéines totales se dosent par la méthode de BRADFORD (1976) par référence à une gamme étalon de sérum albumine bovine.

### **I.4.4.- Composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles**

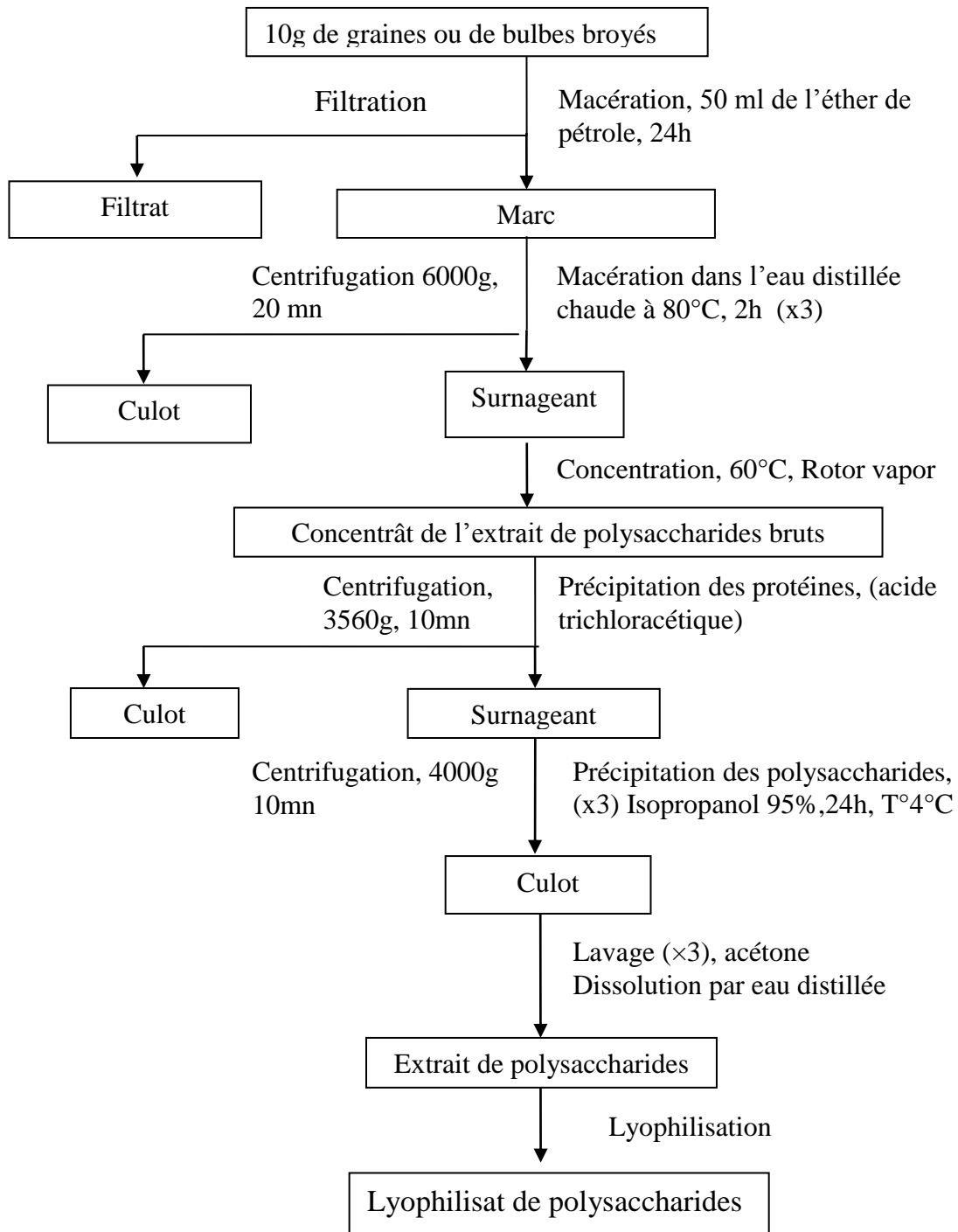
La composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles concerne la détermination des cendres totales, le dosage des protéines, le dosage des oses neutres et des oses acides. Les analyses sont répétées trois fois supplémentaires.

#### **I.4.4.1.- Détermination de la teneur en cendres totales**

Les cendres totales sont déterminées par incinération des extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles lyophilisés de chaque plante dans un four à moufle de type Heraeus 6072.



**Figure 2.-** Différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* (EBRINGEROVA *et al.*, 2003 ; DIALLO *et al.*, 2003 ; WU *et al.*, 2007)



**Figure 3.-** Différentes étapes de l'extraction des polysaccharides hydrosoluble des graines et de bulbes (IBANEZ et FERRERO, 2003; GUO *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2014)

#### **I.4.4.2.- Dosage des protéines**

La teneur en protéines, est déterminée par la méthode de BRADFORD (1976).

#### **I.4.4.3.- Dosages des oses neutres et des oses acides**

La quantification des oses constitutifs de polysaccharides, s'effectue essentiellement par dosage colorimétrique. Ils reposent sur la réaction des dérivés furfuriques obtenus par action à chaud, d'un acide concentré comme l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), pour divers composés aromatiques, tel que le résorcinol (1,3- dihydroxybenzène) pour le dosage des oses neutres (MONSIGNY *et al.*, 1988), et le méta-hydroxydiphényle pour le dosage des acides uroniques (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973).

En présence d'acide sulfurique concentré et à chaud, les liaisons glycosidiques des polysaccharides subissent une hydrolyse quantitative. La déshydratation des unités osidiques libérées conduit à la formation de dérivés furfuriques. Les dérivés furfuriques, se condensent avec les composés phénoliques (résorcinol et méta-hydroxydiphényle) lors du dosage (MONSIGNY *et al.*, 1988). La mesure des absorbances, à 525nm pour les oses acides et à 540 nm pour les oses neutres, sont effectuées par un spectromètre ultraviolet type LNICAMYEAR-2000. La concentration en oses neutres est obtenue par référence à une gamme étalon d'arabinose et celle des oses acides avec une gamme étalon d'acide glucuronique (MONSIGNY *et al.*, 1988).

##### **I.4.4.3.1.-Préparation des solutions**

La solution de résorcinol, est préparée à une concentration de 6mg/ml d'eau bi-distillée. Elle est maintenue à 4°C à l'abri de la lumière pour un délai d'utilisation maximum d'un mois. Quant à la solution d' $H_2SO_4$  à 80%, elle est préparée à partir d' $H_2SO_4$  concentré à 96% et, maintenue à l'abri de la lumière à température ambiante (MONSIGNY *et al.*, 1988).

La solution de tétraborate de sodium ( $NaH_3BO_4$ ) à 120 mM dans l'acide sulfurique concentré, est préparée en ajoutant doucement sous agitation magnétique, 0,12M de Borax (tétraborate de Sodium) dans une solution d' $H_2SO_4$  96% refroidie entre 0 et 4°C dans un



bain glacé. Elle est maintenue à 4°C à l'abri de la lumière (WARRANT, 2004).

La solution de méta-hydroxydiphényl (MHDP) à 0,15% est préparée dans du NaOH 0,5%, puis conservé à 4°C.

Les solutions étalons sont préparées à l'aide des concentrations allant de 0 à 100 µg/ml de glucose pour les oses neutres, et d'acide glucuronique pour les oses acides respectivement.

#### **I.4.4.3.2.- Dosage des oses neutres (MONSIGNY *et al.*, 1988)**

- Déposer 400 µl de solution à doser ou de l'étalon (le blanc est réalisé à l'eau bi-distillée dans des tubes en verre);
- Ajouter 400 µl de solution résorcinol (6 mg/ml d'eau bidistillée);
- Ajouter 2 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 80%;
- Mettre les tubes à l'étuve à 90°C, pendant 30 mn jusqu'à coloration (couleur jaune brun);
- Laisser refroidir à température ambiante pendant 30 mn à l'abri de la lumière;
- Lire l'absorbance à la longueur d'onde de 450 nm à la spectroscopie UV Visible.

#### **I.4.4.3.3.- Dosage des acides uroniques (BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN, 1973)**

- Dans des tubes en verre, ajouter 400µl de solution à doser ou de l'étalon;
- Ajouter 2,4ml de solution sulfurique de tétraborate de sodium;
- Agiter les tubes puis les maintenir 20mn dans un bain-marie à 80°C;
- Après refroidissement dans un bain de glace, ajouter 80µl de solution de MHDP;
- Agiter les tubes puis laisser au repos pendant 10mn;
- Lire l'absorbance à 525nm.

#### **I.4.4.3.4.- Calcul de la concentration en oses neutres et acides**

Les concentrations en oses neutres et en acides uroniques des extraits de polysaccharides, sont déterminées par la méthode de correction développée par

MONTREUIL *et al.*(1963). Il est alors possible de corriger les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses neutres et réciproquement.

L'analyse spectrophotométrique des solutions témoins d'oses neutres (Glc) et d'acides uroniques (Glc A.) permet de tracer les droites d'étalonnages du dosage. La pente de chaque droite étalon est ensuite mesurée :

Dosage au résorcinol: Pente =  $\alpha$  pour le Glc

Pente =  $\beta$  pour le Glc A

Dosage au MHDP : Pente =  $\alpha'$  pour le Glc

Pente =  $\beta'$  pour le Glc A

A partir de ces pentes et en fonction des densités optiques (D.O) mesurées lors des dosages, les concentrations en acides uroniques (AU) et oses neutres (ON) sont déterminées grâce aux expressions suivantes :

$$\text{D.O résorcinol} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{AU}]$$

$$\text{D.O MHDP} = \alpha' [\text{ON}] + \beta' [\text{AU}]$$

On a alors :

$$[\text{ON}] = \text{D.O}_{\text{résorcinol}} - \beta [\text{AU}] / \alpha$$

$$[\text{AU}] = \alpha [\text{D.O}_{\text{MHDP}} - \alpha' \text{D.O}_{\text{résorcinol}}] / \alpha \beta' - \alpha' \beta$$

## I.5. - Caractérisation structurale des polysaccharides

L'analyse structurale des polysaccharides, est un exercice souvent difficile. Elle nécessite la mise en œuvre de méthodes complémentaires qui peuvent être chimiques, enzymatiques ou physiques (YANG et ZHANG, 2009).

### I.5.1.- Identification et dosage des résidus glycosidiques

Pour déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, il est procédé à son hydrolyse (RUIZ, 2005). L'optimisation des conditions d'hydrolyse, est effectuée par

chromatographie sur couche mince (CCM). Les monosaccharides libérés, sont analysés aussi bien par chromatographie échangeuse d'anions haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC- PAD) que par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électronique (GC/MS-EI).

### **I.5.1.1.- Hydrolyse des liaisons glycosidiques**

La dépolymérisation peut être conduite avec des acides à concentrations variables sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction), selon la nature et la structure du polysaccharide. Les différents types de liaisons osidiques présentent des taux d'hydrolyse variables en fonction de la stabilité relative des liaisons. De même, la nature des liaisons glycosidiques entre deux unités osidiques contiguës, présente une différence de stabilité par rapport au cas usuel de deux unités glucosidiques liées en (1-4). Les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre sous la forme furanose, anhydro ou deoxy. Le suivi cinétique d'une hydrolyse, est une étape préliminaire indispensable pour définir les conditions optimales de la libération des oses simples sans toutefois en altérer irréversiblement la structure des oses constitutifs (RUIZ-MATUTE *et al.*, 2011).

#### **I.5.1.1.1.- Optimisation des conditions d'hydrolyse**

Le rendement d'hydrolyse, est très dépendant des conditions opératoires. Une température trop élevée du milieu réactionnel, provoque la dégradation de certains oses. La force de l'acide peut entraîner une dégradation des acides uroniques par décarboxylation. La stabilité des monosaccharides libres en solution, variant fortement d'un ose à l'autre, nécessite la mise au point de conditions optimales d'hydrolyse pour chaque type de polysaccharides (RUIZ, 2005).

L'optimisation des conditions d'hydrolyse vise des rendements maximaux en monosaccharides (glucose, xylose, arabinose, fructose, etc.), tout en réduisant au minimum la libération des substances toxiques tels que les composés furfuraliques (RUMPEL et DIGNAC, 2006).

L'hydrolyse acide se base généralement sur l'utilisation de l'acide chlorhydrique, de l'acide sulfurique ou de l'acide trifluoroacétique (TFA) à des températures élevées (MORRISON, 1988). Le TFA est devenu l'acide de choix pour la plupart des analyses de glucides en raison de son efficacité à l'hydrolyse des liaisons glycosidiques sans causer des destructions massives des composants de monosaccharides résultant et en raison de sa volatilité, ce qui minimise son interférence avec les procédures ultérieures comme l'analyse par HPAEC-PAD (MORRISON et STEWART, 1998 ; TALAGA *et al.*, 2002 ; RUIZ, 2005 ; JOHANSSON *et al.*, 2006).

Les modalités pratiques de la mise en œuvre de l'hydrolyse, sont définies en termes de concentration en acide trifluoroacétique 0,5M, 2M et 4M sous diverses conditions opératoires, de température à 80°C et à 100°C et de temps de réaction de 30 mn à 5 heures (fig. 4). L'évolution du profil est suivie par chromatographie sur couche mince. L'analyse qualitative des principaux oses neutres et acides libérés et les différentes conditions d'hydrolyses recommandées, sont comparées par CCM. Les composés furfuraliques, produits de dégradation des oses sont dosés par spectrophotométrie.

#### **I.5.1.1.2.-Mode opératoire (MORRISON et STEWART, 1998 ; JOHANSSON, 2006; ZHANG *et al.*, 2007b)**

Le mode opératoire adopté est le suivant:

- Utiliser des flacons à vis de petit volume nettoyé et séché;
- Noter sur chaque flacon l'origine des polysaccharides, la température, la concentration de l'acide, et le temps d'hydrolyse;
- Peser dans les flacons 25 mg de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles;
- Ajouter 1 ml d'acide trifluoroacétique 0,5M, 2M, ou 4M;
- Chauffer à 80C° ou à 100C° à l'étuve;
- Récupérer les flacons de l'étuve à 30mn puis à chaque heure jusqu'à 5h;
- Refroidir les flacons au bain de glace;
- Verser l'hydrolysate dans l'Eppendorf étiqueté;
- Centrifuger l'hydrolysate à 10000g pendant 10mn;
- Récupérer le surnageant dans des boîtes de Pétri de petit volume ou dans des verres de montre;

- Ajouter quelques gouttes de méthanol;
- Déposer les boîtes de Pétri dans un dessiccateur sous vide pendant 24 heures;
- Après évaporation et séchage total de l'hydrolysate, ajouter 500 µl de l'eau distillée;
- Récupérer les hydrolysats dans des tubes.

#### **I.5.1.1.3.- Suivi d'hydrolyse par chromatographie sur couche mince**

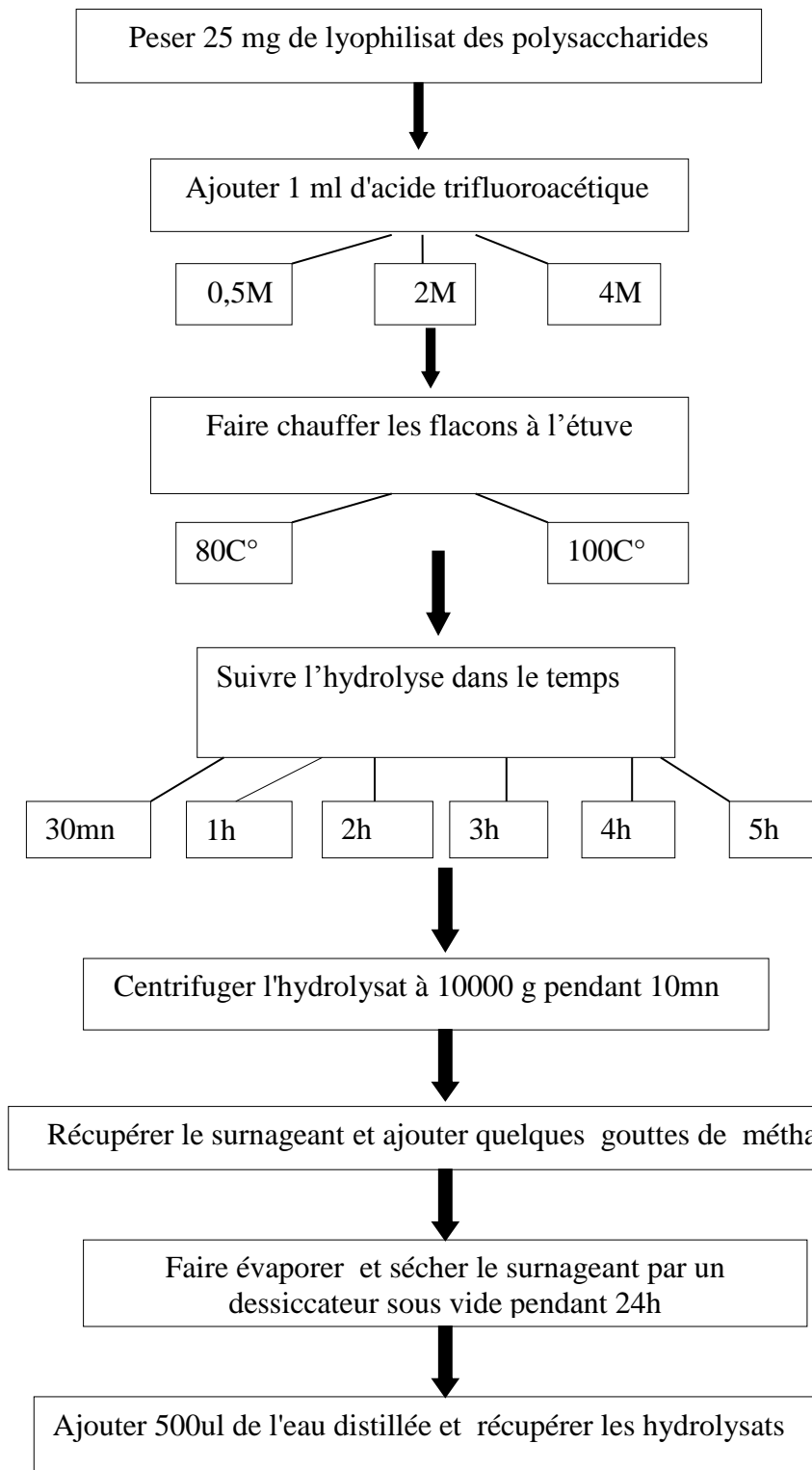
Les oligosaccharides et les monosaccharides libérés, sont analysés par CCM. C'est une technique rapide et mais aussi adaptée pour un suivi de la dépolymérisation des polysaccharides. Elle permet d'estimer l'altération des oses constitutifs. Deux systèmes de séparation (1 et 2), sont utilisés.

Pour le système 1, la phase mobile est constituée de butanol-acétate d'éthyle-isopropanol-acide acétique-eau dans les proportions 7-20-12-7-6 (MEZZETI *et al.*, 1971). La phase stationnaire, des plaques en gel de silice de type Silica gel 60 F 254 de 0,25mm d'épaisseur sur feuille d'aluminium imbibées par l'acide borique de 0,03M, sont utilisées (MEZZETI *et al.*, 1971).

Pour le système 2, la phase mobile est constituée de butanol-acide acétique-eau (4-2-2) (RUIZ, 2005). Pour la phase stationnaire, sont utilisées des plaques en gel de silice prêtes à l'emploi, de type Silica gel 60 F 254 de 0,25 mm d'épaisseur, sur feuille d'aluminium (WANG et FANG, 2004). Comme révélateur des spots spécifiques des glucides, le réactif de Nigrum est utilisé (PAULSEN *et al.*, 2002). Le facteur de rétention ( $R_f$ ) est calculé pour chaque spot obtenu.

#### **I.5.1.1.4. - Dosage des composés furfuraliques par la méthode DUBOIS**

L'hydrolyse des polysaccharides, est une étape essentielle pour l'analyse structurale et l'obtention des oligosaccharides à valeur ajoutée comme prébiotique. L'hydrolyse acide est l'une des méthodes utilisées en raison de son faible coût. Cependant, au cours de l'hydrolyse acide, de nombreux produits de dégradation tels que le furfural et le 5-hydroxyméthyl furfural, sont formés. Ces produits de dégradation, sont des inhibiteurs potentiels de la croissance microbienne conduisant, à une faible productivité.



**Figure 4.-** Processus de l'hydrolyse des polysaccharides dans différentes conditions opératoires (MORRISON et STEWART, 1998; JOHANSSON, 2006; ZHANG *et al.*, 2007b)

Le furfural et le 5-hydroxy-méthyl furfural, sont les plus toxiques en raison de leurs concentrations élevées dans les hydrolysats. Ils endommagent les microorganismes par réduction des activités enzymatiques et biologiques, détruisant leur ADN et inhibent la synthèse des protéines et de l'ARN (ZHANG *et al.*, 2013a).

En milieu acide et à chaud, les oses se transforment en dérivés furfuriques qui en se complexant avec le phénol (chromogène), donnent des composés de couleur orange (DUBOIS, 1956). Les pentoses, les hexoses et les acides uroniques, se déshydratent respectivement en dérivés du furfural, 5-hydroxyméthylfurfural et de l'acide 5-formylfuroïque. Le dosage de ces composés se fait par spectrophotomètre UV-VIS à 492nm. Les concentrations en dérivés furfuriques, sont déduites à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec le glucose de 0 à 10µg/ml.

Pour le mode opératoire, les étapes sont les suivantes:

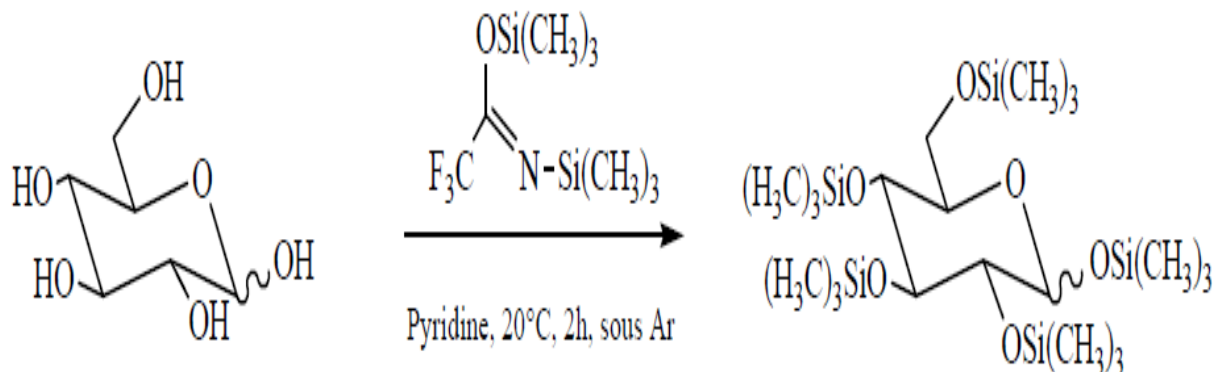
- Déposer 500µl de solution à doser ou de l'étalon (le blanc est réalisé à l'eau bidistillée);
- Ajouter 500µl de solution phénol à 5% (5mg/ml d'eau bidistillée);
- Lire l'absorbance à la longueur d'onde 492nm au spectrophotomètre moléculaire.

### **I.5.1.2.-Identification et dosage des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électronique (GC/MS-EI)**

La chromatographie en phase gazeuse est une technique d'analyse sensible et polyvalente, à cause de sa haute résolution dans la séparation des mélanges complexes, et sa capacité à coupler à différents détecteurs permet d'apprécier qualitativement et quantitativement la composition de différents extraits glucidiques (RUIZ, 2005; RUIZ-MATUTE *et al.*, 2011).

#### **I.5.1.2.1.- Hydrolyse et triméthylsilylation des échantillons**

Après la libération des oses lors de l'hydrolyse, les résidus glycosidiques, sont transformés en glycosides *O*-triméthylsilylés par réaction des *O*-glycosides avec du *N,O*-bis-triméthylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA) 99% stabilisé par du chlorure de triméthylsilane (TMSCl) 1% dans de la pyridine anhydre (KAMERLING *et al.*, 2007) (fig. 5).



**Figure 5.-**Méthode de triméthylsilylation des O-glycosides (KAMERLING *et al.*, 2007)

#### I.5.1.2.2.- Principe de la spectrométrie de masse à ionisation électronique

La spectrométrie de masse est destinée à l'analyse des substances en phase gazeuse. Cette méthode très sensible trouve toute son utilité lorsqu'un chromatographe est placé en amont (CPG-MS) (WARRAND, 2004).

#### I.5.1.2.3.- Mode opératoire

Après la libération des oses lors de l'hydrolyse, 10mg de monosaccharides lyophilisés, sont dissous dans 2ml de pyridine auxquels il est ajouté 2ml de Sylon (BSTFA/TMCS; 99/1), à température ambiante pendant 2 heures et sous Argon. Après évaporation sous jet d'azote des réactifs en excès, les triméthylsilyl-O-glycosides, sont repris dans 500 $\mu$ l de dichlorométhane (KAMERLING *et al.* 1975 ; MONTREUIL *et al.* 1986). L'analyse s'effectue par GC/MS en utilisant un système de chromatographie gazeuse Agilent séries 6890 couplé à un détecteur sélectif de masse Agilent 5973 Network. 1 $\mu$ l seulement de la solution est injecté. L'injection est réalisée en colonne Agilent HP-1 (30 m, 0,32 mm, 0,25  $\mu$ m, Hewlett Packard). La pression du gaz vecteur (hélium), est de 8,8 psi et le débit est de 2,3 ml/mn. La température est programmée pour une première étape à 100°C pendant 3mn, un incrément de 8°C/mn jusqu'à 200°C pour 1mn et puis un incrément final de 5°C/mn jusqu'à 250°C. L'ionisation est effectuée par l'impact électronique (E-I, eV 70), la température de piégeage, est placée à 150°C et l'ion cible, est fixé de 40 à 800 m/z (WARRAND, 2004).



L'identification des oses neutres et des acides uroniques, est réalisée lors de la même injection par comparaison des temps de rétention relatifs à l'étalon interne. Un coefficient de réponse propre à chaque résidu, est également appliqué pour quantifier chaque monosaccharide (WARRANT, 2004).

### **I.5.1.3.- Chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) à détection ampérométrique pulsée (PAD)**

Pour la détermination des glucides ne nécessitant aucune dérivation préalable; la chromatographie par échange d'anion, additionnée à la sensibilité et la sélectivité d'une détection par ampérométrie pulsée, est utilisée. La séparation des oses n'est néanmoins possible que dans des conditions alcalines extrêmes ( $\text{pH} > 11$ ) nécessaires à l'ionisation des groupements hydroxyles des oses. Cette détection possède deux intérêts ; tout d'abord une grande sensibilité, mais aussi une bonne sélectivité, puisque le choix du cycle voltampérométrique permet de sélectionner précisément les composés qui seront détectés. Le signal obtenu est principalement lié à l'oxydation de l'alcool primaire porté par le carbone 6 (CHATAIGNÉ, 2007).

Les glucides hydrosolubles se comportent comme des acides faibles avec de  $\text{pK}_a$  plus de 11, donc les groupements hydroxyles des oses dans le milieu alcalin peuvent s'ioniser en oxyanions ( $\text{R-O}^-$ ). Les oses seront alors séparables selon leur  $\text{pK}_a$  et leur affinité avec la phase stationnaire  $\text{NR}_4^+$  de la colonne qui joue le rôle d'échangeur d'anions (KAMERLING *et al.*, 2007).

La détection ampérométrique pulsée (PAD) associée à l'appareil permet une détection de l'ordre d'une dizaine de picomoles. Les composés passent en sortie de colonne dans une cellule de mesure munie d'une cathode et d'une anode en or. Ils seront alors attirés par l'une ou par l'autre des électrodes produisant un courant électrique enregistré par le conductimètre (potentiel de mesure). Afin d'éviter tout encrassement des électrodes par dépôt des molécules analysées, un potentiel de nettoyage (potentiel d'oxydation maximal puis potentiel de réduction maximal), est envoyé régulièrement entre les deux électrodes. Cela entraîne la désorption des produits d'oxydation des glucides et permet après réduction de l'oxyde d'or à la surface de l'électrode en or, la détection au cycle suivant du premier potentiel (WARRANT, 2004).

L'appareillage est un système dionex [dionex corporation, sunnyvale (CA), USA] composé d'une unité de dégazage de l'éluant, d'une pompe pouvant fonctionner en gradient et d'un détecteur électrochimique pulsé (PED 50) à électrode en or. Le système est également muni d'un injecteur automatique. Les colonnes utilisées sont des colonnes spécifiques dionex comprenant une précolonne (4× 75 mm) et une colonne analytique CarboPac PA 1 (4× 250 mm) dont la phase fixe est constituée de billes de divinylbenzène de 10 µm enrobées de latex et présentant des groupements ammonium quaternaires (WARRANT, 2004).

#### **I.5.1.3.1.- Préparation des échantillons**

Les polymères (3 mg, 0,6% m/v), sont placés dans des tubes hermétiques pour être hydrolysés à l'acide trifluoroacétique dans les conditions optimales, puis ils sont lyophilisés et remis en solution dans 1 ml d'eau distillée.

#### **I.5.1.3.2.- Application d'HPAEC-PAD**

Il est injecté 25µl de l'échantillon. L'élution est ensuite réalisée à un débit de 1ml/mn, selon la nature des oses (neutres ou acides). Les éluants sont réalisés à l'aide d'eau distillée dégazée à l'hélium.

Une élution isocratique à l'aide d'une solution de NaOH 16 mM (Baker Analytical grade, solution de soude décarbonatée à 50% m/v), est réalisée dans le cadre de l'analyse des monosaccharides de type neutre.

Parallèlement, les acides uroniques, qui présentent des capacités supérieures de fixation sur la colonne, seront élués en utilisant un gradient d'acétate de sodium 600 mM (solvant B) dans NaOH 16 mM (solvant A). L'acétate de sodium a pour effet de déplacer de manière progressive les monosaccharides fixés sur la phase stationnaire du fait du nombre important de leurs fonctions R-O<sup>-</sup>.

On utilise le gradient suivant en 4 étapes:  
- 10mn : 0% de solvant B et 100% de solvant A,

- de 10 à 40 mn : de 0% à 100% de solvant B,
- Plateau de 40 à 45 mn : 100% de B solvant B,
- de 45 à 60 mn : de 100 à 0% de solvant B.

Après détection, les différents oses sont identifiés par leur temps de rétention spécifique et quantifiés après intégration du signal (chromleon management system Dionex) (WARRANT, 2004), par comparaison avec des courbes étalons établies avec les monosaccharides de référence.

## **I.6.- Activités biologiques**

L'étude des activités biologiques porte sur les substances bioactifs constitutifs des plantes médicinales utilisées traditionnellement pour leurs propriétés pharmacologiques en phytothérapie. La présente étude, s'intéresse particulièrement à l'activité anti-complément et les effets prébiotiques sur une bactérie lactique, des polysaccharides issus des différentes plantes spontanées à caractère médicinal retenues.

### **I.6.1.- Activité anti-complément**

Le complément est un système complexe reconnu pour son rôle dans l'immunité. Toutefois, s'il est actif de manière inappropriée ou excessive, il peut être à l'origine de nombreux dommages cellulaires caractéristiques de plusieurs pathologies inflammatoires (GASQUE *et al.*, 1996). L'implication du complément dans la régulation et la synchronisation du processus inflammatoire demeure bénéfique pour l'hôte puisqu'elle vise à éliminer les organismes pathogènes et les cellules de l'hôte qui sont endommagées (MARTEL, 2009).

Paradoxalement, les multiples associations entre le complément et les autres médiateurs qui contribuent au bon maintien de l'organisme, peuvent rapidement devenir responsables de l'avènement de diverses pathologies si une mauvaise régulation a lieu. Une déficience en un ou plusieurs des facteurs du complément ou, à l'inverse, une activation excessive du complément, peut contribuer au développement de diverses maladies auto-immunes ou inflammatoires, tel la glomérulonéphrite, le syndrome hémolytique urémique,

l'hémoglobininurie paroxystique nocturne, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la septicémie, la pancréatite aigüe et diverses maladies cardiovasculaires (MARTEL, 2009).

Les plantes à activité anti-inflammatoire, sont des espèces ayant une action sur plusieurs facteurs de l'immunité extra et intracellulaire comme ceux du complément et, sont le plus souvent des plantes contenant des polysaccharides spécifiques ayant une activité immunomodulatrice. Les polysaccharides sont les constituants immunostimulants les plus efficaces (GOETZ, 2004). Les espèces *Astragalus armatus*, *Plantago notata*, *Asphodelus tenuifolius*, et *Urginea noctiflora* ont retenu l'attention en premier lieu pour leur utilisation traditionnelle à Ghardaïa comme anti-inflammatoire et, en second lieu, en raison du peu de travaux d'activités biologiques répertoriés sur ces quatre espèces végétales.

#### **I.6.1.1.-Principe de l'étude de l'activité anti-complément**

L'étude de l'activité anti-complément des polysaccharides, porte sur la détermination de leur pouvoir d'inhibition de la lyse des hématies catalysées par le complément. Elle est exprimée en  $CI_{50}$  (la concentration de polysaccharides nécessaire pour inhiber 50% de l'hémolyse) (MICHAELSEN *et al.*, 2000).

Le test de fixation de complément comprend deux étapes qui sont respectivement, la détermination de  $CH_{50}$  de sérum hémolytique et la détermination des  $CI_{50}$  des polysaccharides. Les étapes de fixation de complément, sont consignées dans la figure 6.

#### **I.6.1.2.- Test $CH_{50}$**

Le test  $CH_{50}$  a pour objectif de déterminer la dilution de sérum capable de donner 50% de la lyse des hématies catalysées par le complément constitutif (NAHM et BURTON, 2011). Le test  $CH_{50}$  est utilisé pour estimer la puissance des composés protéiques de système du complément. Les composés sont pré-incubés avec du sérum avant l'addition des cellules, la consommation d'unités  $CH_{50}$  peut résulter de: (i) l'activation des protéines du complément et la diminution ultérieure du niveau des composants natifs capables de réagir avec des cellules, ou (ii) l'inhibition de l'activité protéique sur la surface cellulaire, ce qui conduit à une protection contre la lyse cellulaire médiée par le complément. Afin de distinguer entre

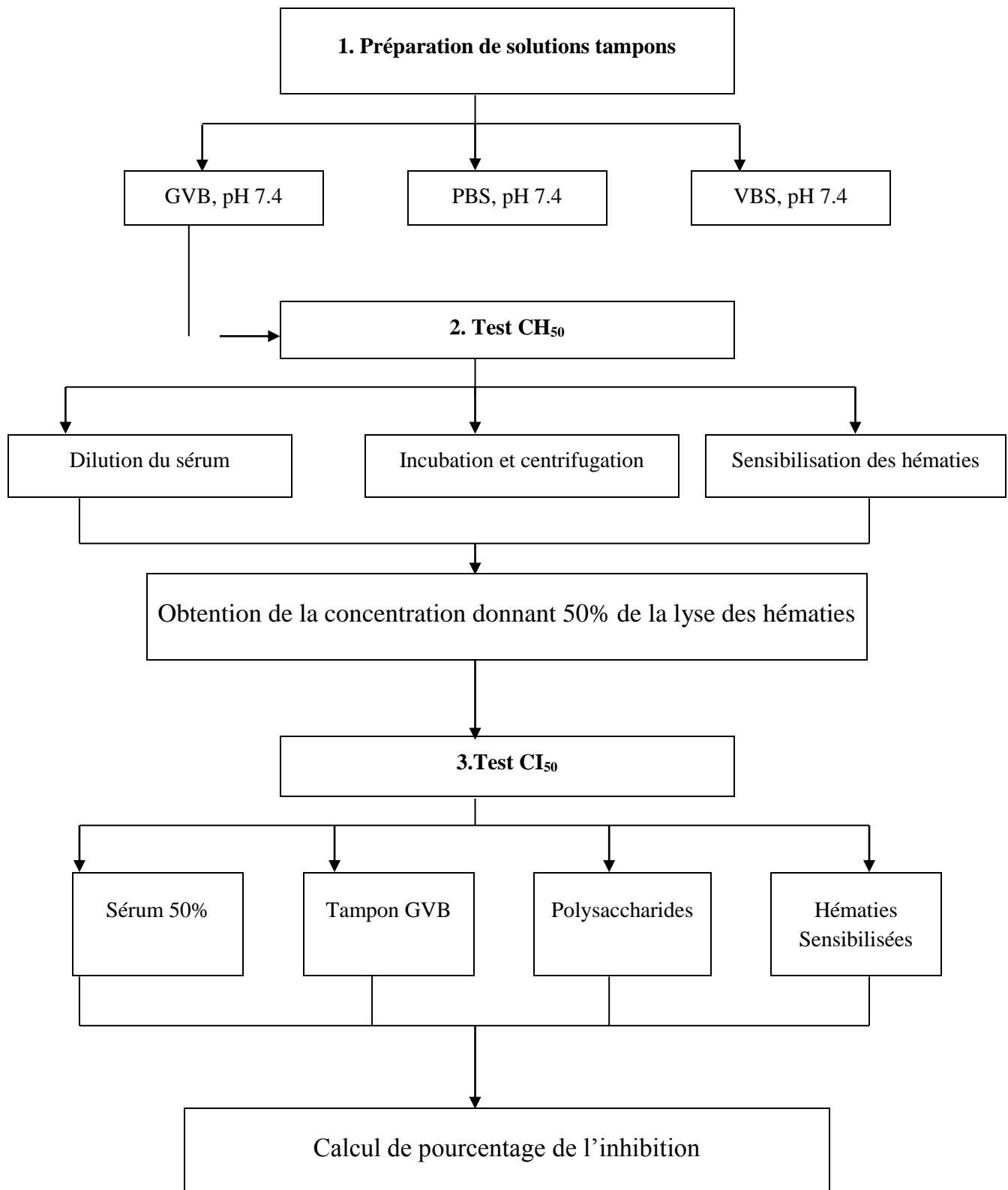
ces deux possibilités pour l'activité des polysaccharides, il est développé un test basé sur le protocole de CH<sub>50</sub>.

La lyse d'une hématie par le système du complément procède par la réaction en cascade des composants du complément avec différents sites sur la surface de la cellule. L'épuisement des composants du complément du sérum ou d'autres fluides corporels dans les maladies peuvent être détectés par la mesure de l'activité hémolytique globale, suivant la méthode de KABAT et MAYER (1961). Il est habituel d'exprimer les résultats de tests par l'unité hémolytique total du complément, CH<sub>50</sub> (STRONG *et al.*, 1978).

Chaque type de sérum humain est co-incubé avec des hématies humaines A<sup>+</sup> et B<sup>+</sup> sensibilisées avec des anticorps Anti-A et Anti-B, respectivement. Les hémolysines activent la cascade du complément pour former de complexes d'attaque de la membrane. Ces complexes vont perforer la membrane des hématies et entraîner la libération de l'hémoglobine (NAHM et BURTON, 2011). Après incubation, la suspension est centrifugée et la densité optique du surnageant est lue à 540nm (COSTABILE, 2010).

Pour chaque type du sérum, les hématies sensibilisées utilisées pour le test sont de même groupe sanguin pour éviter le problème de l'agglutination.

La procédure de test CH<sub>50</sub> porte sur l'extraction et lavage des hématies, puis sensibilisation, ainsi préparation et dilution des sérums (fig. 7).



**Figure 6.-** Etapes de test de fixation du complément (XU et *al.*, 2007) (modifiées)

#### **I.6.1.2.1.- Extraction des hématies**

Les hématies sont obtenues après centrifugation du sang prélevé dans de tube EDTA à 2000rpm pendant 10mn.

#### **I.6.1.2.2.- Lavage des hématies**

Les hématies sont lavées deux fois avec de l'eau physiologique (SAMUELSEN *et al.*, 1999b), et une fois avec le tampon véronal de gélatine (GVB) à pH 7,4 (WANG *et al.*, 2008).

#### **I.6.1.2.3.- Sensibilisation des hématies**

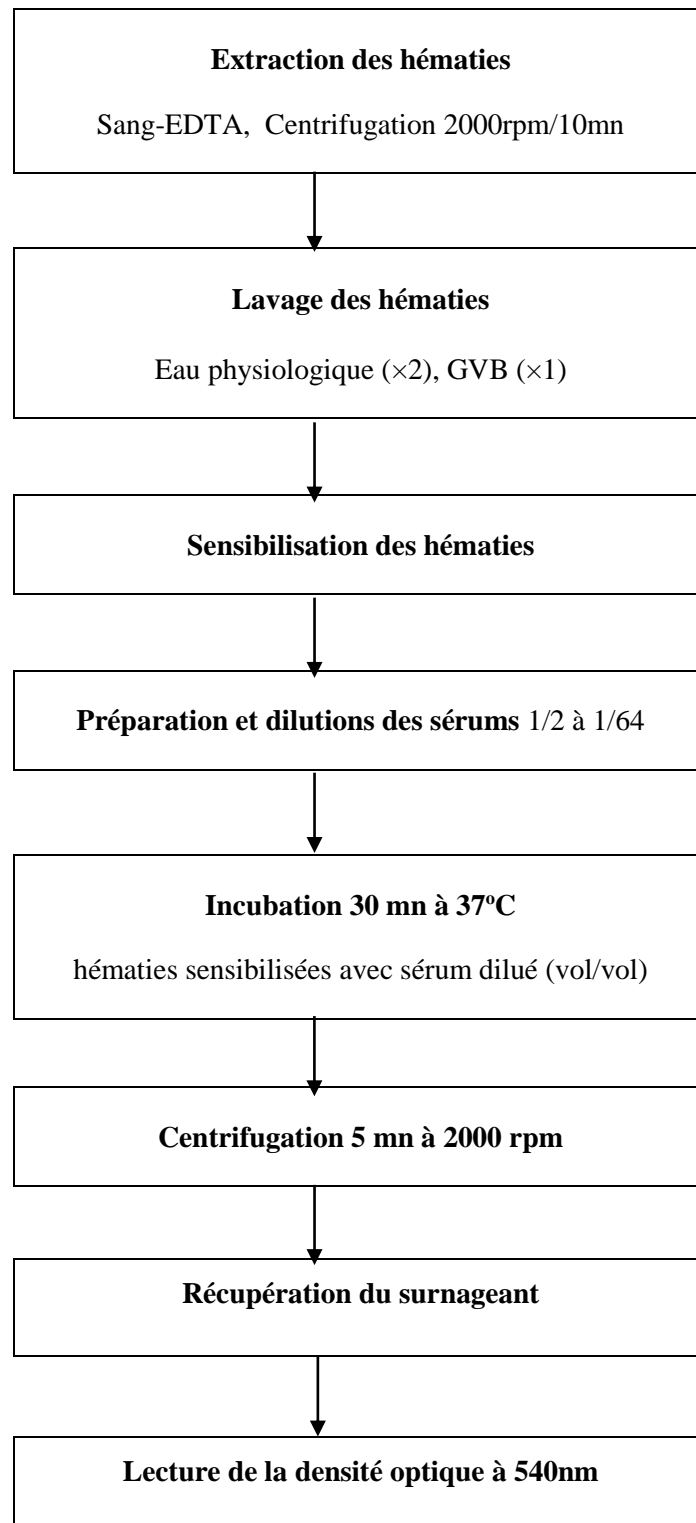
La sensibilisation est la fixation d'anticorps sur les déterminants antigéniques de la surface des hématies sans évidence d'agglutination et/ou d'hémolyse (TISSOT *et al.*, 2011). Elle est effectuée selon les méthodes de CHESNEAU (2002) et COSTABILE (2010).

- Préparer une suspension cellulaire de 10% d'hématies dans 500µl de tampon;
- Ajouter 125µl de sérum anti-hématies;
- Incuber 15mn à 37°C en bain thermostaté;
- Laver les hématies sensibilisées trois fois avec le tampon véronal de gélatine;
- Après chaque lavage centrifuger les hématies à 1000rpm pendant 5mn et éliminer le liquide surnageant;
- Préparer une suspension cellulaire de 1% dans le tampon puis conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

#### **I.6.1.2.4.- Préparation et dilutions des sérums**

Le sang humain est prélevé de volontaires sains dans des tubes stériles, sans addition de facteur anticoagulant. Après 30mn à 37°C, le sang est coagulé puis centrifugé à 2000rpm pendant 10mn afin d'obtenir du sérum (MICHAELSEN *et al.*, 2000).

Le sang humain est dilué dans le tampon (DIALLO *et al.*, 2001). Une série de dilutions est préparée (tab. 4).



**Figure 7.-** Différentes étapes du test CH<sub>50</sub> (COSTABILE, 2010 ; NAHM et BURTON, 2011)  
(modifiées)



**Tableau 04.-** Méthode de dilution du sérum

Dilutions	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Sérum (µl)	500	500	500	500	500	500	500
Tampon (µl)	0	500	500	500	500	500	500

**I.6.1.2.5.- Expression de test CH<sub>50</sub>**

Pour le calcul du degré de lyse, il est déterminé l'absorbance de lyse à 100% et l'absorbance de lyse catalysée par les sérums. Les analyses sont répétées trois fois.

**I.6.1.2.5.1.- Lyse à 100%**

L'hémolyse à 100% est obtenue par l'ajout de l'eau distillée aux hématies sensibilisées. Il est ajouté des volumes égaux d'eau distillée aux suspensions des hématies sensibilisées 1% préparée dans l'eau distillée (SAMUELSEN *et al.*, 1999b ; DIALLO *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2007).

**I.6.1.2.5.2.- Lyse catalysée par les sérums**

Selon COSTABILE *et al.* (2010), la concentration hémolytique de 50% des hématies, est obtenue par l'incubation de volumes égaux d'hématies sensibilisées et de sérum dilué dans le tampon (tab. 5).

**Tableau 5.-** Différentes dilutions du test CH<sub>50</sub>

Dilutions	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Sérum dilué (µl)	500	500	500	500	500	500
GR sensibilisés (µl)	500	500	500	500	500	500

**I.6.1.2.5.3.- Calcul du degré de la lyse**

Après incubation de 30mn à 37°C avec agitation (COSTABILE, 2010), les tubes sont

centrifugés à 2000rpm pendant 5mn. L'absorbance du surnageant est lue à 540nm (COSTABILE, 2010). Le degré de la lyse des hématies est calculé (DIALLO *et al.*, 2001).

$$\text{Pourcentage (\%)} \text{ de la lyse} = (A_{\text{contrôle}} / A_{\text{eau}}) \times 100\%$$

$A_{\text{contrôle}}$ : Absorbance de l'hémoglobine libérée lors de l'incubation des hématies sensibilisées avec le sérum dilué à 540 nm,

$A_{\text{eau}}$ : Absorbance de l'hémoglobine libérée lors de l'incubation des hématies sensibilisées avec l'eau distillée à 540 nm.

### **I.6.1.3.- Test CI<sub>50</sub>**

Le test CI<sub>50</sub> porte sur les dilutions de sérum hémolytique 50, de contrôle positif, et des polysaccharides.

#### **I.6.1.3.1.- Principe du test CI<sub>50</sub>**

*In vitro*, l'activité anti-complément est déterminée par le test de fixation du complément basé sur la consommation de complément et le degré de lyse des hématies par le complément résiduel (WANG *et al.*, 2008). Le test fait appel à la méthode modifiée de MAYER. Les différentes dilutions des échantillons d'essai 200µl sont pré-incubées avec 200µl du sérum hémolytique 50 et 400µl du tampon GVB à 37°C pendant 10mn (XU *et al.*, 2007). Puis 400µl d'hématies sensibilisées, sont ajoutés, et le mélange est incubé à 37°C pendant 30mn (XI *et al.*, 2012). Après centrifugation à 1700rpm pendant 10 mn (SAMUELSEN *et al.*, 1999b), l'absorbance du liquide surnageant est lue à 540nm (COSTABILE, 2010). L'héparine servira comme contrôle positif (XI *et al.*, 2012).

#### **I.6.1.3.2.- Dilution de sérum hémolytique 50**

Les sérum utilisés sont dilués, de concentrations donnant 50% de lyse des cellules indicatrices (WANG *et al.*, 2008; AUSTARHEIM *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2007; DIALLO *et al.*, 2001).

### I.6.1.3.3.- Dilution de contrôle positif

L'héparine est utilisée comme control positif selon XU *et al.* (2007), XIE *et al.* (2007) et XI *et al.* (2012). Elle est de type sodique 5000UI/ml. C'est un médicament anti-thrombotique portant le nom commercial de Léo<sup>®</sup> produit par la société pharma product. Les différentes concentrations de l'héparine, sont préparées à partir d'une solution mère de 1mg/ml. Selon WANG *et al.* (2008), les dilutions de polysaccharides et d'héparine, sont respectivement 200µg/ml, 400µg/ml, 600µg/ml, 800µg/ml, et 1000µg/ml (tab. 6).

**Tableau 6.-** Différentes dilutions de l'héparine

Concentration (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
Solution mère (µl)	0	200	400	600	800	1000
Tampon (µl)	1000	800	600	400	200	0

### I.6.1.3.4.- Dilutions des polysaccharides

Les concentrations de polysaccharides, se préparent à partir d'une solution mère de concentration de 1mg/ml (tab. 7).

**Tableau 7.-**Formulation des différentes dilutions de polysaccharides des plantes testées

Espèces végétales	Concentration (µg/ml)	0	200	400	600	800	1000
<i>A. armatus</i> (A)	Solution mère (µl)	0	200	400	600	800	1000
	Tampon (µl)	1000	800	600	400	200	0
<i>P. notata</i> (P)	Solution mère (µl)	0	200	400	600	800	1000
	Tampon (µl)	1000	800	600	400	200	0
<i>A. tenuifolius</i> (AS)	Solution mère (µl)	0	200	400	600	800	1000
	Tampon (µl)	1000	800	600	400	200	0
<i>U. noctiflora</i> (U)	Solution mère (µl)	0	200	400	600	800	1000
	Tampon (µl)	1000	800	600	400	200	0

### **I.6.1.3.5. - Inhibition catalysée par le contrôle positif et les polysaccharides**

Les volumes des polysaccharides, d'hématies sensibilisées, de sérum et de tampon qui seront utilisés pour le test  $CI_{50}$ , sont consignés dans le tableau 8.

### **I.6.1.3.6. - Calcul de pourcentage de l'inhibition**

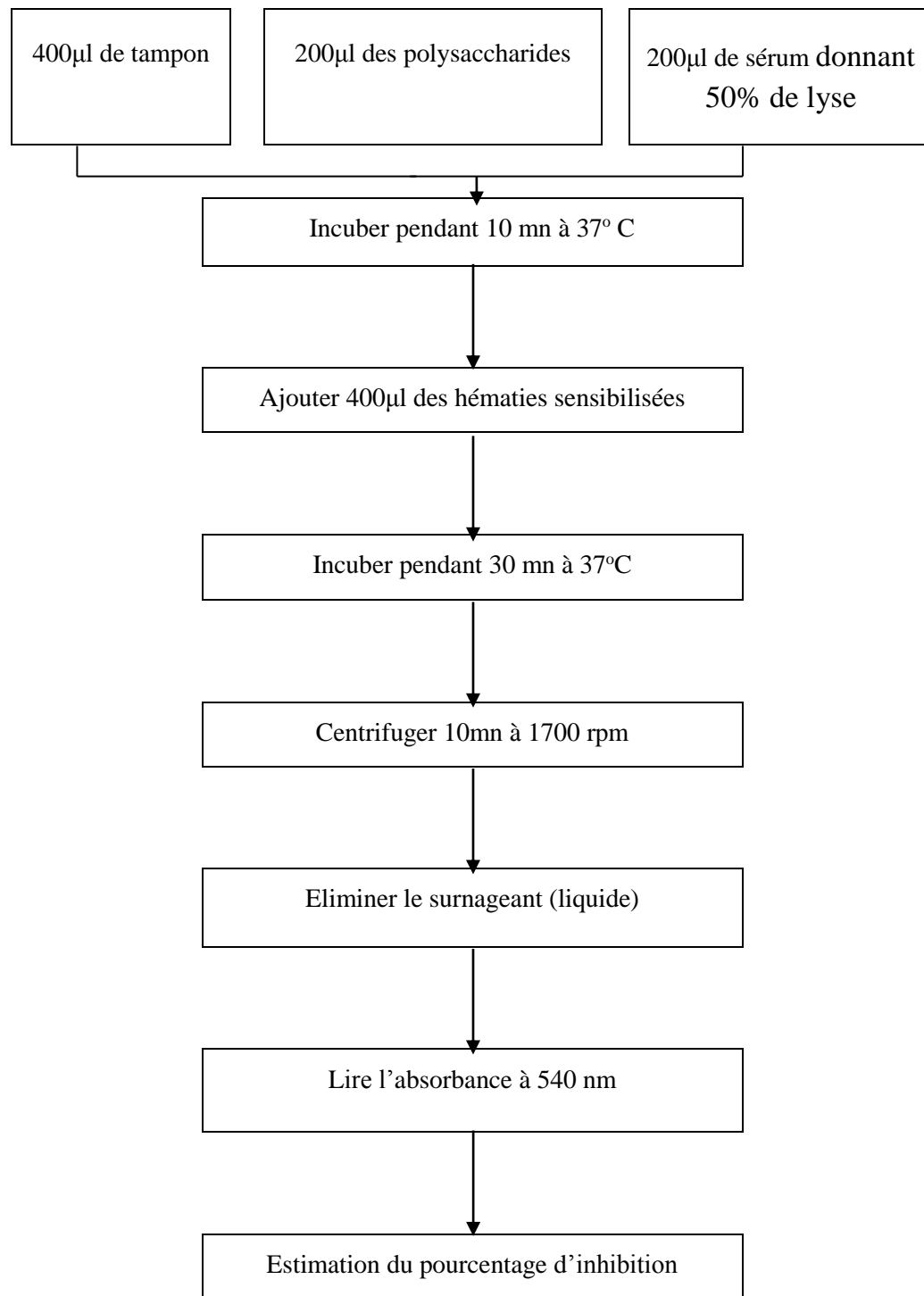
Le pourcentage d'inhibition de l'activité du complément, est exprimé par l'inhibition de la lyse des hématies, se calcule selon la formule (HROMADKOVA *et al.*, 2013):

$$\text{Pourcentage (\%)} \text{ d'inhibition} = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{Contrôle}} \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$ : Absorbance de l'hémoglobine libéré lors de l'incubation des hématies sensibilisées avec le sérum sans polysaccharide à 540nm,

$A_{\text{test}}$ : Absorbance de l'hémoglobine libéré lors de l'incubation des hématies sensibilisées avec le sérum, en présence polysaccharide à 540nm.

Une valeur faible de  $CI_{50}$  traduit une forte activité de fixation de complément (AUSTARHEIM *et al.*, 2012). Les étapes de test  $CI_{50}$ , sont consignées dans la figure 8.



**Figure 8.-** Différentes étapes du test CI<sub>50</sub> (XIE et *al.*, 2007; WANG et *al.*, 2008) (modifiées)

**Tableau 08.-** Différentes dilutions du test CI<sub>50</sub>

Concentrations (µg/ml)		0	200	400	600	800	1000
<b>Contrôle positif</b>	Sérum (µl)	200	200	200	200	200	200
	Tampon (µl)	600	400	400	400	400	400
	Hématies sensibles (µl)	400	400	400	400	400	400
	Héparine (µl)	0	200	200	200	200	200
<b><i>Astragalus armatus</i></b> (A)	Sérum (µl)	200	200	200	200	200	200
	Tampon (µl)	600	400	400	400	400	400
	Hématies sensibles (µl)	400	400	400	400	400	400
	Polysaccharides (µl)	0	200	200	200	200	200
<b><i>Plantago notata</i></b> (P)	Sérum (µl)	200	200	200	200	200	200
	Tampon (µl)	600	400	400	400	400	400
	Hématies sensibles (µl)	400	400	400	400	400	400
	Polysaccharides (µl)	0	200	200	200	200	200
<b><i>Urginea noctiflora</i></b> (U)	Sérum (µl)	200	200	200	200	200	200
	Tampon (µl)	600	400	400	400	400	400
	Hématies sensibles (µl)	400	400	400	400	400	400
	Polysaccharides (µl)	0	200	200	200	200	200
<b><i>Asphodelus tenuifolius</i></b> (AS)	Sérum (µl)	200	200	200	200	200	200
	Tampon (µl)	600	400	400	400	400	400
	Hématies sensibles (µl)	400	400	400	400	400	400
	Polysaccharides (µl)	0	200	200	200	200	200

### I.6.2.- Activité prébiotique

Les prébiotiques sont des ingrédients alimentaires glucidiques, non digestibles stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'éléments de la flore colique, parmi lesquels les bactéries probiotiques, ingérées vivantes par l'hôte, produisant des effets bénéfiques sur sa santé (SYNYTSYA *et al.*, 2009). Les oligosaccharides issus de la dégradation des polysaccharides naturels comme les fructooligosaccharides, les galactooligosaccharides et les arabinogalactooligosaccharides, sont étudiés pour leur action

prébiotique (PALFRAMAN *et al.*, 2002 ; GENESTIE, 2006). A cet effet, il est apparu opportun d'évaluer l'activité des oligosaccharides obtenu au cours de l'optimisation d'hydrolyse des extraits de polysaccharides sur la multiplication d'une bactérie probiotique.

### I.6.2.1.- Hydrolysats des polysaccharides

Les hydrolysats des polysaccharides sont utilisés comme source carbonée dans le milieu de culture de la souche. L'origine et les conditions d'hydrolyse des polysaccharides, sont consignés dans le tableau 9.

**Tableau 9.-** Hydrolysats des polysaccharides et les conditions d'hydrolyse  
(TFA: Acide trifluoroacétique)

Origine de polysaccharides	Condition d'hydrolyse		
	TFA	Temps	Température °C
<i>Astragalus armatus</i>	0,5M	1h	80
<i>Plantago notata</i>	0,5M	2h	80
<i>Asphodelus tenuifolius</i>	0,5M	3h	80
<i>Urginea noctiflora</i>	2M	30 mn	80

### I.6.2.2.- Elimination des monosaccharides par fermentation

La production d'oligosaccharides à l'échelle préparative, est réalisée à partir des polysaccharides extraits des plantes médicinales. L'hydrolyse mis en œuvre pour l'obtention des oligosaccharides, s'effectue dans des conditions optimales définies. Toutefois, l'analyse par CCM, des produits obtenus après hydrolyse indique une teneur élevé en monosaccharides. Leur présence n'est pas souhaitable dans la fraction oligosaccharidique qui sera soumise aux tests ultérieurs de mesure d'activité prébiotique. En effet, des concentrations élevées en glucose et mannose libres sont susceptibles d'engendrer un biais lors de l'interprétation des résultats concernant la stimulation de la croissance de la souche probiotique testée (YOON *et al.*, 2003).

### **I.6.2.2.1.- *Saccharomyces cerevisiae***

La purification sélective des oligosaccharides présents dans les hydrolysats est effectuée par fermentation de la levure. La souche *Saccharomyces cerevisiae* utilisée est d'origine Saf-Instant fournie par S. I. Le saffre 59703-Marcq- France, levure déshydratée sous forme bâtonnet. La levure est caractérisée par leur capacité à fermenter une quantité importante de monosaccharides de 170 à 240g/l (LARPENT, 1990).

### **I.6.2.2.2.- Mise en culture**

Les solutions de control positif (glucose) et d'hydrolysats de polysaccharides sont préparées à une concentration de 450mg/ml en glucide dans du tampon phosphate 0,1 M (pH6,8), et autoclavées à 120°C pendant 15mn. La fermentation s'est déroulée en anaérobie dans des flacons à 30°C avec addition de 1g de levure lyophilisée ( $2,9 \times 10^{10}$  ufc/g) par 100ml de solution. Après 32 heures, le milieu de culture est centrifugé à 4000 rpm pendant 15mn. Le surnageant est séparé du culot cellulaire, conservé à -20°C, puis lyophilisé pendant 48 heures. La composition glucidique est analysée par chromatographie sur couche mince (GOULAS *et al.*, 2006).

### **I.6.2.2.3.- Analyse de la composition glucidique des milieux de culture par CCM**

La composition glucidique des hydrolysats après élimination des oses simples par fermentation est vérifiée par CCM en déposant en parallèle, sur une même plaque, un mélange des oses étalons (arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, et acide glucuronique) et des solutions des hydrolysats avant et après fermentation. Les plaques chromatographiques utilisées sont des plaques en gel de silice type Silica gel 60 F 254 de 0,25 mm d'épaisseur, sur feuille d'aluminium. La phase mobile est constituée de Chloroforme- Butanol- Méthanol- Eau-Acide acétique dans les proportions de 4,5- 12,5- 5- 1,5- 1,5. Le réactif de Nigrum est utilisé comme révélateur des spots.

### **I.6.2.3.- Milieu de culture**

*Lactobacillus casei* est cultivée sur milieu Man Rogosa Sharpe (MRS). Les tests sont effectués en milieu liquide. Le milieu spécifique MRS est reconstitué en substituant le



glucose par des sources carbonées. Les sources carbonées sont du RP 95 et des hydrolysats de polysaccharides. Le prébiotique fructooligosaccharides (RP 95), est utilisé comme témoin positif. Pour valider les conditions de culture de la souche, le milieu MRS à base de glucose est utilisé comme témoin de croissance. Le milieu MRS sans source carbonée servira de témoin négatif (GENESTIE, 2006).

#### **I.6.2.4.- Procédure de test**

L'effet de l'addition d'oligosaccharides dans le milieu de culture d'une souche probiotique, est quantifié en suivant la croissance de la souche microbienne, sa capacité à produire des acides gras à chaînes courtes, estimée par la mesure du pH et de l'acidité titrable de milieu de culture (RENDON-HUERTA *et al.*, 2011).

##### **I.6.2.4.1.- Préparation des milieux de culture à base d'hydrolysats**

Le milieu de culture spécifique MRS est reconstitué sans glucose et à une concentration finale pour tous les ingrédients 1,2 fois supérieure à la valeur normale. Après autoclavage pendant 15mn à 121°C, la quantité de source de carbone nécessaire à la croissance du microorganisme est dissoute dans 20ml d'eau bidistillée puis additionnée à 100ml de milieu spécifique stérile. Le pH initial du bouillon est de 6,7. La solution est homogénéisée puis filtrée stérilement sur membrane 0,22µm (Millipore). Le milieu de culture stérile est réparti en fraction de 9ml dans des tubes en verre stériles de 20ml (GENESTIE, 2006).

##### **I.6.2.4.2.- Inoculation des milieux de culture**

A partir d'une préculture de la souche sur gélose MRS à 37°C pendant 24 heures, trois colonies sont prélevées et dilués dans 30ml de milieu MRS liquide sans source carbonée, puis un prélèvement de 1ml de cette dilution est ajouté au 9ml de milieu de culture. Après homogénéisation, les milieux de culture ensemencés, sont incubés à 37°C en aérobiose (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2012).

#### **I.6.2.4.3.- Suivi de la croissance bactérienne**

Le suivi de croissance se fait par mesure de la densité optique à 570nm (moyenne réalisée sur trois tubes identiques) de la culture sur chaque source de carbone, à intervalles de temps réguliers. Pour établir le blanc, environ 500µl de milieu de culture, est prélevé avec une seringue stérile avant ensemencement. Pour déterminer la charge initiale de la culture (T0), environ 500µl de milieu de culture est prélevé de chaque type de source carbonée juste après l'ensemencement et homogénéisation des tubes, ensuite les tubes, sont placés dans l'étuve à 37°C en aérobiose (GENESTIE, 2006). Pour une suivie de cinétique, après chaque 3 heures, il est prélevé 500µl de milieu de culture homogénéisé de chaque type de source carbonée afin de déterminer la densité optique.

Après 24 heures de suivi, les milieux de cultures sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 mn puis le surnageant est récupéré et congelé dans des Eppendorf.

#### **I.6.2.4.4.- Mesure de pH**

Le pH des milieux de culture est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (CORRADINI *et al.*, 2004).

#### **I.6.2.4.5.- Acidité titrable**

L'estimation des acides gras à courte chaîne produits par fermentation des sources carbonées est effectuée par titrage acido-basique. L'acidité est titrée de façon précise à l'aide de soude N/9 (Soude Dornic). Un échantillon de 1ml est placé dans un bêcher contenant 9ml d'eau distillée en présence de 0,1 ml de phénol phtaléine à 1%. La soude est ajoutée à la burette jusqu'au virage au rose de l'échantillon. La coloration doit persister 10 secondes. L'acidité est exprimée en degré Dornic qui correspond au nombre de 1/10 de ml de soude Dornic N/9 nécessaires pour assurer la neutralisation totale de l'acide (GUIRAUD, 1998).

*Chapitre II*  
*Résultats et discussion*

## II.1.- Caractérisation physico-chimique du matériel végétal

Les résultats d'analyses physico-chimiques des différentes parties des plantes étudiées, sont regroupés dans le tableau 10. Les teneurs en cendres se situent entre  $3,64 \pm 0,20\%$  pour les graines d'*Astragalus armatus* et  $6,74 \pm 1,31\%$  pour les bulbes d'*Urginea noctiflora*. Les graines de *Plantago notata* renferment  $6,29 \pm 0,59\%$  de cendres alors que la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* n'en contient que  $4,54 \pm 0,19\%$ . Le pourcentage en cendre varie d'une espèce végétale à l'autre, mais aussi selon les différentes parties. FEMENIA *et al.* (1999) signalent  $15,37 \pm 0,32\%$  de cendres totales dans les feuilles d'*Aloe barbadensis* (Lilliaceae). Elles sont relativement plus élevées que celles de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* ( $4,54 \pm 0,19\%$ ). Les graines d'*Astragalus armatus* renferment  $3,64 \pm 0,20\%$  de cendres, semblent plus proche de celles des graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) soit 3,9g/100g (MADHAVA NAIDU *et al.*, 2011).

Au vu des résultats, il apparaît une différence de concentrations en éléments minéraux selon les espèces végétales. La teneur en calcium de  $2241 \pm 106$ ppm chez *Asphodelus tenuifolius*, est élevée. Elle est suivie de celle de *Plantago notata*, soit  $1118,32 \pm 205$ ppm. Pour *Astragalus armatus* et *Urginea noctiflora*, les taux sont respectivement de  $420 \pm 138$ ppm et  $337 \pm 68$ ppm, apparaissent relativement faibles. Pour les teneurs en sodium, dans les différentes parties étudiées des espèces végétales s'avèrent semblables. Elles varient, entre  $746 \pm 190$ ppm pour la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* et  $940 \pm 263$ ppm pour les graines d'*Astragalus armatus*. Toutefois, la concentration en potassium, est beaucoup plus élevée chez *Plantago notata* ( $2047 \pm 771$ ppm) alors qu'elle est faible chez *Urginea noctiflora* ( $551 \pm 198$ ppm). En revanche, les taux de magnésium des différentes parties des végétaux investies, varient dans une gamme assez large de  $189 \pm 35$ ppm (*Urginea noctiflora*) à  $871 \pm 261$ ppm (*Asphodelus tenuifolius*). Pour HAMURCU *et al.* (2010), les différences de concentrations en éléments minéraux entre les différentes espèces végétales étudiées, pourraient être probablement dues à la différence des tissus, à la nutrition des plantes, au climat et aux états de sol. GUO *et al.* (2007) signalent des valeurs élevées en calcium (1500ppm) et en potassium (8500ppm) dans les graines de *Plantago ovata*, par rapport à celles des graines de *Plantago notata* ( $1118,32 \pm 205$ ppm de calcium et  $2047 \pm 771$ ppm de potassium). DIAZ MEDINA *et al.* (2007) rapportent des taux de calcium de  $535 \pm 187$ mg/kg et  $263 \pm 76$  mg/kg dans les fruits d'*Opuntia dillenii* et *Opuntia ficusindica* (Lilliaceae) respectivement.

**Tableau 10.-** Composition chimique et biochimique du matériel végétal étudié

Composition	Matériel végétal étudié			
	<i>P. notata</i>	<i>A. tenuifolius</i>	<i>A. armatus</i>	<i>U. noctiflora</i>
Protéines (%)	9,25±0,91	5,60±0,39	5,98±0,68	6,44±0,79
Oses totaux (%)	19,86±0,10	13,69±1,05	20,98±1,23	18,78±0,14
Lipides(%)	1,80±0,04	1,93±0,02	1,29±0,09	0,99±0,13
Fibres(%)	51,91±3,04	60,61±1,14	55,62±0,89	63,80±0,82
Cendres (%)	6,29±0,59	4,54±0,19	3,64±0,20	6,74±1,31
<b>Eléments minéraux (ppm):</b>				
Ca	1118,32±205	2241±106	420±138	337±68
Na	864±142	746±190	940±263	809 ± 237
K	2047±771	783±177	568±148	551±198
Mg	563±141	871±261	218±112	189±35

Ces teneurs sont plus faibles que celles trouvées dans la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*. MADHAVA NAIDU *et al.*, (2011), notent chez les graines de fenugrec (Fabaceae), 1759ppm de calcium, 1990ppm de magnésium, 7700ppm de potassium et 669ppm de sodium. Ces teneurs sont plus élevées par rapport à celles des graines d'*Astragalus armatus*. Mais pour cette même espèce dans les graines, le sodium est plus élevé (669ppm). FEMENIA *et al.* (1999) signalent chez *Aloe vera* 1,82±0,09% de sodium, 1,84±0,05% de potassium et un faible pourcentage de magnésium soit 0,90±0,12%. Cependant, DIAZ MEDINA *et al.* (2007), rapportent des taux de potassium de 908±251mg/kg de sodium (153±162 mg/kg) et de magnésium (454±102 mg/kg) dans les fruits d'*Opuntia dillenii*. Le taux de potassium est plus important par rapport à la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*, (783±177ppm de potassium), alors que les taux de sodium (153±162 mg/kg) et du magnésium (454±102 mg/kg) chez *Opuntia dillenii* sont inférieurs.

Les résultats du tableau 10, montrent que les graines de *Plantago notata* sont les plus riches en protéines, avec 9,25±0,91% par rapport à la matière sèche. La partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* et les graines d'*Astragalus armatus* apparaissent avec des pourcentages de 5,60±0,39% et de 5,98±0,68%, respectivement. Donc, ils sont plus proche. Pour les feuilles d'*Aloe barbadensis*, le taux de protéines est de 7,26±0,33%. Il

est proche de ceux d'*Asphodelus tenuifolius* ( $5,60\pm 0,39\%$ ) et d'*Urginea noctiflora* ( $6,44\pm 0,79\%$ ) (FEMENIA *et al.*, 1999). DIAZ MEDINA *et al.* (2007) notent des taux dans les fruits d'*Opuntia dillenii* de  $0,52\pm 0,12\%$  et d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae) de  $0,90\pm 0,26\%$ , sont faibles comparativement à la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* ( $5,60\pm 0,39\%$ ) et les bulbes d'*Urginea noctiflora* ( $6,44\pm 0,79\%$ ). Dans les bulbes d'*Urginea maritima*, le taux de protéines de  $5,60\pm 0,39\%$ , est inférieur à celui d'*Urginea noctiflora* ( $6,44\pm 0,79\%$ ) (METIN et BURUN, 2010). Les graines de fenugrec n'en contiennent que 5% de protéines (MADHAVA NAIDU *et al.*, 2011). Les graines de *Plantago ovata* sont constitués de  $0,94\pm 0,00\%$  de protéines, sont faible comparées à celles de *Plantago notata* ( $9,25\pm 0,91\%$ ) (GUO *et al.*, 2007).

Les fractions de lipides obtenues à partir des différentes matières végétales sont relativement faible et proches les unes des autres, avec un intervalle étroit. Les bulbes d'*Urginea noctiflora* contiennent  $0,99\pm 0,13\%$  de lipides. La partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* ne renferme que  $1,93\pm 0,02\%$ . FEMENIA *et al.* (1999) remarque un taux de  $4,21\pm 0,12\%$  de lipides dans les feuilles d'*Aloe barbadensis*. DIAZ MEDINA *et al.* (2007) signalent des taux faibles dans les fruits d'*Opuntia dillenii* ( $0,71\pm 0,19\%$ ) et d'*Opuntia ficus indica* (Lilliaceae) ( $0,50\pm 0,13\%$ ). Les graines d'*Astragalus armatus* en contiennent  $1,29\pm 0,09\%$ , moins que celles du fenugrec ( $6,71\pm 0,01\text{g}/100\text{g}$ ) (MADHAVA NAIDU *et al.*, 2011). Celles de *Plantago notata* renferment  $1,80\pm 0,04\%$  de lipides. GUO *et al.* (2007) signalent des taux de l'ordre de  $0,00\pm 0,11\%$  dans les téguments des graines de *Plantago ovata*.

Cependant, pour les oses totaux, la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* renferment  $13,69\pm 1,05\%$ . Ils sont  $18,78\pm 0,14\%$  et  $19,86\pm 0,10\%$  chez *Urginea noctiflora* et *Plantago notata*, respectivement. Ils atteignent  $20,98\pm 1,23\%$  dans les graines d'*Astragalus armatus* où ils demeurent l'un des composants les plus importants. FEMENIA *et al.* (1999) rapportent  $16,48\pm 0,18\%$  d'oses totaux dans les feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae). Les bulbes d'*Urginea noctiflora* renferment  $82,58\pm 0,96\%$  d'hydrates de carbone, supérieurs à ceux de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* ( $74,30\pm 2,19\%$ ), d'*Allium sativum* ( $73,03\pm 0,06\%$ ), et d'*Allium cepa* ( $76,71\pm 0,11\%$ ) (ONYEIKE *et al.*, 1995). Les graines de *Plantago notata* n'en possède qu'un taux faible ( $71,77\pm 3,14\%$ ) par rapport aux téguments des graines de *Plantago ovata* ( $84,98\pm 4,26\%$ ) (GUO *et al.*, 2007). Les graines d'*Astragalus armatus* sont riches en fibres brutes avec  $55,62\pm 0,89\%$  par rapport à celles des graines de fenugrec ( $51,2\pm 0,28\%$ ) (MADHAVA NAIDU *et al.*, 2011). Les bulbes d'*Urginea noctiflora* et les graines d'*Astragalus*

*armatus* peuvent être des sources de polysaccharides.

## II.2.- Teneurs en polyphénols, en flavonoïdes et pouvoirs antioxydants

Dans le tableau 11, sont consignés les résultats sur le rendement d'extraction, les taux de polyphénols totaux, de flavonoïdes, et les activités anti-oxydantes (AAO) de polyphénols des extraits.

**Tableau 11.-**Rendement d'extraction, teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et activités antioxydantes (AAO) des extraits

	Rendement (%)	Polyphénols (mgGAE/g)	Flavonoïdes (mg RE/g)	AAO (mgVCE/g)
<b><i>Plantago notata</i></b>				
Hexane	1,52	1,43±0,12	1,04±0,08	0,36±0,65
Chloroforme	4,94	3,60±0,00	1,76±0,35	1,057±0,44
Acétate d'éthyle	1,08	1,74±0,26	1,55±0,97	0,67±0,00
Éthanol	7,4	4,81±1,24	2,87±0,06	4,18±0,99
<b><i>Asphodelus tenuifolius</i></b>				
Hexane	0,73	0,59±0,16	0,45±0,02	0,17±0,02
Chloroforme	2,23	1,08±0,28	0,91±0,1	1,49±0,01
Acétate d'éthyle	2,4	3,88±0,50	2,54±0,63	3,76±0,05
Éthanol	7,43	10,8±1,84	8,33±1,67	5,65±0,13
<b><i>Astragalus armatus</i></b>				
Hexane	8,08	6,54±0,07	5,78±0,11	3,25±0,00
Chloroforme	2,39	1,93±0,24	0,47±0,00	1,312±0,78
Acétate d'éthyle	1,11	0,90±0,18	0,38±0,18	0,012±0,004
Éthanol	6,03	2,78±1,04	1,99±0,05	2,59±0,36
<b><i>Urginea noctiflora</i></b>				
Hexane	0,81	0,48±0,28	1,58±0,06	0,11±0,05
Chloroforme	2,18	1,19±0,50	0,81±0,14	1,32±0,01
Acétate d'éthyle	2,6	4,66±0,16	4,2±0,21	3,76±0,02
Éthanol	6,53	9,81±1,84	8,03±1,67	4,56±0,13

L'extrait à l'hexane des graines d'*Astragalus armatus* a un rendement de 8,08%. Les trois autres extraits, dont celles à l'éthanol de la partie aérienne d'*Asphodelus*

*tenuifolius* (7,43%), des graines de *Plantago notata* (7,4%) et des bulbes d'*Urginea noctiflora* (6,53%), présentent les rendements les plus élevés. Cette différence peut être attribuée à la présence de composés lipophiles (acides gras, caroténoïdes) de poids moléculaire élevé plus soluble dans le premier solvant qui est l'hexane. Pour les extraits au chloroforme, les rendements moyens, sont de 2,18%, 2,23%, et 2,39% chez *Urginea noctiflora* et *Asphodelus tenuifolius*, et *Astragalus armatus* respectivement, avec un pourcentage maximum de 4,94% pour les graines de *Plantago notata*.

Pour les composés phénoliques des extraits de plante, les teneurs varient entre  $0,48 \pm 0,28$  et  $10,8 \pm 1,84$  mgGAE/g de la matière sèche. Les taux élevés en composés phénoliques, sont notés pour les extraits éthanoliques d'*Urginea noctiflora* avec  $9,81 \pm 1,84$  mgGAE/g et d'*Asphodelus tenuifolius* avec  $10,8 \pm 1,84$  mgGAE/g. Les teneurs obtenues pour les extraits à l'hexane, sont de  $0,48 \pm 0,28$  mgGAE/g pour *Urginea noctiflora* et  $0,59 \pm 0,16$  mgGAE/g pour *Asphodelus tenuifolius*. Ces valeurs sont plus faibles. La quantification des phénols totaux, laisse apparaître que les extraits polaires (d'acétate d'éthyle et d'éthanol) d'*Urginea noctiflora* (14,47 mgGAE/g) et d'*Asphodelus tenuifolius* (14,68 mgGAE/g), sont les plus riches en composés phénoliques. Tandis que, la teneur la plus élevée en composés phénoliques des graines d'*Astragalus armatus* (8,47 mgGAE/g) est remarquée dans les extraits apolaires (hexane et chloroforme). Les espèces végétales appartenant à la famille des Liliaceae (*Asphodelus tenuifolius* et *Urginea noctiflora*), présentent les quantités en phénols totaux appréciables par rapport aux espèces des autres familles tels que *Plantago notata* (11,58 mgGAE/g) et *Astragalus armatus* (12,15 mgGAE/g). DJERIDANE signale que l'extrait hydro-alcoolique (méthanol/eau; 80/20: V/V), pendant 48 heures à température ambiante de la partie aérienne de *Plantago ciliata*, renferme  $2,41 \pm 0,03$  mgGAE/g de phénols totaux, semble plus faible que celles des graines de *Plantago notata*.

La détermination des polyphénols totaux dans divers tissus d'espèces du genre *Plantago* a prouvé que les feuilles renferment la plus grande quantité en ces composés. Il est remarqué 10,15% dans de la sous-espèce *Plantago holosteum holosteum*. Les fleurs renferment la moitié de la totalité en polyphénols chez *Plantago argentea* (5,56%). Ce taux est moindre dans les tiges avec un maximum de 4,34% chez la sous-espèce *Plantago scopulorum holosteum* (JURISIC GRUBESIC *et al.*, 2005). Pour LIM *et al.* (2011), les concentrations en composés phénoliques totaux des extraits de graines d'*Astragalus sinicus* L., dépendent du solvant d'extraction. L'extrait acétonique donne le meilleur rendement (27,95 mg/g), suivi par les extraits d'éthanol (21,97 mg/g), d'hexane



(16,14mg/g), et enfin l'eau (6,78mg/g). Les concentrations sont environs 4 fois plus élevées par rapport à celles d'*Astragalus armatus*. Cependant, une telle extraction par graduation de polarité ne donne pas que les polyphénols mais probablement d'autres substances non phénoliques tels que les oses, les protéines et les pigments qui peuvent interférer pendant le dosage des phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu. Par contre, la méthode d'extraction par graduation de polarité a montré son efficacité pour épuiser la plante de ces composés phénoliques.

L'augmentation du métabolisme des composés phénoliques dans certaines plantes étudiées, d'origine saharienne peut être liée aux conditions de stress climatiques (les températures élevées, l'exposition au soleil, la sécheresse, la salinité...) (RAI et CARPINELLA, 2006).

Pour les taux en flavonoïdes d'*Asphodelus tenuifolius* et d'*Urginea noctiflora*, les teneurs les plus élevés sont de  $10,87 \pm 2,30 \text{mgRE/g}$  et  $12,23 \pm 1,88 \text{mgRE/g}$ , respectivement. Les faibles teneurs sont notées avec les extraits apolaires de *Plantago notata* ( $2,80 \pm 0,44 \text{mgRE/g}$ ) et les extraits polaires d'*Astragalus armatus* ( $3,68 \pm 1,22 \text{mgRE/g}$ ). DJERIDANE (2008) rapporte que l'extrait hydro-alcoolique (méthanol/eau; 80/20: V/V) pendant 48 heures à température ambiante de la partie aérienne de *Plantago ciliata* renferme  $2,31 \pm 0,01 \text{mg/g}$  équivalent en catéchine de flavonoïdes, semble proche de celle de l'extrait éthanolique des graines de *Plantago notata*, soit  $2,87 \pm 0,06 \text{mgRE/g}$ . Les racines d'*Astragalus membranaceus* contiennent  $11,51 \pm 0,03 \text{mg/g}$  de flavonoïdes totaux (KUO *et al.*, 2009). L'extrait d'acétone des graines d'*Astragalus sinicus* L., renferme des quantités supérieures en flavonoïdes totaux ( $17,52 \text{mg/g}$ ) que celle à l'éthanol ( $13,57 \text{mg/g}$ ), à l'hexane ( $9,34 \text{mg/g}$ ), et à l'eau ( $5,17 \text{mg/g}$ ) (LIM *et al.*, 2011). Elles sont plus supérieures à celles des flavonoïdes dans les extraits d'éthanol ( $1,99 \pm 0,05 \text{mgRE/g}$ ), d'hexane ( $5,78 \pm 0,11 \text{mgRE/g}$ ) des graines d'*Astragalus armatus*. Au vu des résultats, les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes sont fortement affectées par les solvants d'extraction.

Les résultats d'activités anti-oxydantes obtenus, sont exprimés en milligramme (mg) équivalent vitamine C par gramme de matière sèche (mgVCE/g). Les valeurs des activités anti-oxydantes des extraits varient entre  $0,012 \pm 0,004 \text{mgVCE/g}$  et  $5,65 \pm 0,13 \text{mgVCE/g}$  pour l'extrait à l'acétate d'éthyle des graines d'*Astragalus armatus* et l'extrait éthanolique de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* respectivement. Les valeurs élevées en polyphénols indiquent une activité antioxydante relativement

importante. C'est le cas de l'extrait éthanolique des bulbes d'*Urginea noctiflora* ( $4,56 \pm 0,13 \text{mgVCE/g}$ ), de l'extrait éthanolique de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* ( $5,65 \pm 0,13 \text{mgVCE/g}$ ), de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* ( $3,76 \pm 0,05 \text{mgVCE/g}$ ), et de l'extrait à l'héxane des graines d'*Astragalus armatus* ( $3,25 \pm 0,00 \text{mgVCE/g}$ ). L'activité antioxydante de l'extrait à l'acétone des graines d'*Astragalus sinicus* L., montre une capacité à neutraliser le radical libre DPPH puissante de 95,1% à 10mg/ml, une activité antiradical hydroxyle de 89,4% à 15 mg/ml, et une activité de balayage d'anion superoxyde de 74,5% à 15 mg/ml (LIM *et al.*, 2011). L'extrait hydro-alcoolique (méthanol/eau; 80/20 : V/V) de la partie aérienne de *Plantago ciliata* montre un pouvoir antioxydant exprimé en concentration inhibitrice de 50% de l'activité de DPPH, de  $3,40 \pm 0,04 \text{mg/l}$  (DJERIDANE, 2008). Les activités de piégeage des radicaux de DPPH vont de 92,5 à 95,1 pour les extraits d'acétone, de 82,7 à 84,1 pour l'éthanol, de 71,8 à 75,8 pour l'hexane, et de 54,3 à 55,9% pour l'eau, pour des concentrations allant de 10 à 20mg/ml des graines d'*Astragalus sinicus* L. Les activités de balayage de radical hydroxyle des extraits des graines d'*Astragalus sinicus*, sont classées en acétone >éthanol>hexane>eau (LIM *et al.*, 2011). De nombreuses études, signalent une relation étroite entre l'activité antioxydante et la quantité de composés phénoliques totaux ou en flavonoïdes totaux. La mesure de l'activité antioxydante des extraits de différentes sources végétales est en conformité avec les quantités de composés phénoliques et des flavonoïdes présents.

### II.3.- Composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles

Le tableau 12 donne les rendements et la composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles des différentes parties des plantes investies. Il apparaît que les rendements massiques d'extraits de polysaccharides hydrosolubles par rapport aux matières sèches sont de 2,13% dans la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*, 4,21% dans les graines d'*Astragalus armatus*, 5,33% dans les bulbes d'*Urginea noctiflora* et 8,27% dans les graines de *Plantago notata*. YIN *et al.* (2012) signalent un rendement de 6,2% de polysaccharides hydrosolubles extraits à chaud dans les graines de *Plantago asiatica* L.. Ce rendement, est inférieur, à celui des graines de *Plantago notata*, soit 8,27%. Le rendement massique de polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* (2,13%), est supérieur de celui du cactus d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae) (1,33%) (SEPULVEDA *et al.*, 2007) et d'*Opuntia milpa alta* (0,65%) (CAI *et al.*, 2008).

**Tableau 12.-** Rendements et composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles

	Matériel végétal			
	<i>P. notata</i>	<i>A. tenuifolius</i>	<i>A. armatus</i>	<i>U. noctiflora</i>
Rendement (%)	8,27	2,13	4,21	5,33
Humidité (%)	6,23 ±0,07	8,23±0,03	7,88±0,23	10,97±0,16
Cendres (%)	4,17 ±0,22	8,62 ±0,43	5,79 ±0,14	3,65±0,08
Protéines (%)	1,34±0,31	1,89±0,56	1,96±0,78	2,30±0,09
Oses totaux (%)	78,92±1,10	80,86±1,80	82,42±1,40	85,44±1,28
Oses neutres (%)	56,84±0,43	70,58±0,57	78,42±0,29	84,53±0,37
Acides uroniques (%)	22,08±0,78	10,28±1,29	3,89±1,11	0,91±0,91

Le rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles, à partir des graines de *Cassia ovata* (Fabaceae), est de 3,2%. Il est proche du rendement d'*Astragalus armatus*, soit 4,2% (KUMAR *et al.*, 1990). En revanche, ZHANG *et al.*(2011) notent 10,73% de polysaccharides chez *Astragalus mongholicus*, dans la plante entière. Cette valeur est nettement supérieure à celle d'*Astragalus armatus*, soit 4,2%. L'optimisation des conditions d'extraction des polysaccharides hydrosolubles des bulbes de *Lilium lancifolium* Thunb par YOU *et al.* (2010), donne des rendements allant de 6,54% jusqu'à 8,12%. De même, il a été constaté que le rapport du solvant par rapport à la matière première et la température d'extraction, ont un effet important sur le rendement d'extraction des polysaccharides. L'extraction des polysaccharides hydrosoluble des graines d'*Asparagus officinalis* (Liliaceae) grossièrement dépouillées de leurs téguments et finement broyées, et après élimination des lipides montre un rendement de 6,9% (JAKIMOW-BARRAS, 1973). Certes, le rendement massique de polysaccharides hydrosolubles d'extraits des feuilles dépend de l'état éco-physiologique de la plante, notamment l'accumulation de fructane chez la chicorée est induite en cas de stress hydrique et nitrique. En outre, ce polymère est dégradé au cours de refleurissement de la plante au printemps (BUCKERIDGE *et al.*, 2000). De même, le type de polysaccharide et la procédure d'extraction comme la décoction, la macération, le type et la quantité de solvant, etc., agissent aussi sur le rendement massique de polysaccharides hydrosolubles d'extraits des feuilles (EBRINGEROVA *et al.*, 2003). Le rendement d'extrait des polysaccharides hydrosoluble à partir des racines d'*Astragalus membranaceus* est de 0,67% de la matière fraîche (LI et ZHANG, 2009). L'extraction des polysaccharides

hydrosolubles à chaud représente  $8,81\pm 0,17\text{g}/100\text{g}$  de racines sèches d'*Astragalus membranaceus*, apparaît le double de celui d'*Astragalus armatus*, soit 4,21% (NIU *et al.*, 2011).

La teneur en oses totaux représente la somme des oses neutres et des acides uroniques (WU *et al.*, 2007). Les oses totaux, sont les composants majeurs des extraits polysaccharidiques et leurs teneurs sont presque semblables. Elles représentent  $78,92\pm 1,10\%$  de l'extrait polysaccharidique de *Plantago notata* et  $85,44\pm 1,28\%$  de l'extrait polysaccharidique d'*Urginea noctiflora*. Une différence appréciable des taux d'acides uroniques entre les extraits polysaccharidiques, est perceptible. L'extrait polysaccharidique de *Plantago notata* est constitué de  $22,08\pm 0,78\%$  d'acides uroniques et celui d'*Asphodelus tenuifolius* renferme  $10,28\pm 1,29\%$ , tandis que les extraits polysaccharidiques d'*Astragalus armatus* et d'*Urginea noctiflora*, sont constitués de très faible quantité en acide uroniques. Il apparaît que les extraits polysaccharidiques de *Plantago notata* et d'*Asphodelus tenuifolius* sont constitués de polysaccharides hétérogènes neutres et acides. Les polysaccharides d'*Astragalus armatus* et d'*Urginea noctiflora* sont de type neutre.

Les polysaccharides hydrosolubles extraits des graines de *Plantago asiatica* renferment  $3,01\pm 0,11\%$  de cendres,  $1,24\pm 0,05\%$  de protéines et  $87,80\pm 0,10\%$  d'oses totaux. Les taux de cendres et de protéines sont inférieurs à ceux de *Plantago notata* ( $4,17\pm 0,22\%$  et  $1,34\pm 0,31\%$ ). Tandis que la teneur en oses totaux, est nettement supérieure de celle de *Plantago notata*, soit  $78,92\pm 1,10\%$ . L'étude de FEMENIA *et al.* (1999) sur les polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae) donne  $7,41\pm 0,54\%$  de cendres et  $79,95\pm 2,12\%$  d'oses totaux, sont proche de ceux d'*Asphodelus tenuifolius*, soit  $8,62\pm 0,43\%$  et  $80,86\pm 1,80\%$ , respectivement. Le taux en protéines est très élevé, soit  $10,12\pm 0,65\%$  par rapport à celui d'*Asphodelus tenuifolius* ( $1,89\pm 0,56\%$ ). NIU *et al.* (2011) signalent  $1,10\pm 0,11\%$  des teneurs en protéines totales dans l'extrait polysaccharidique des racines d'*Astragalus membranaceus*, inférieur à celui d'*Astragalus armatus* ( $1,96\pm 0,78$ ). L'étude de la composition de l'extrait des polysaccharides de la partie aérienne d'*Astragalus mongholicus* Bunge, effectuée par KIYOHARA *et al.* (2010) montre  $88,93\%$  d'oses totaux,  $6,78$  d'acides uroniques, et  $5,64\%$  de protéines. Ces pourcentages sont supérieurs à ceux d'*Astragalus armatus*.

## II.4. - Caractérisation des polysaccharides

La caractérisation structurale des polysaccharides porte sur la détermination de la composition molaire en monosaccharides.

### II.4.1.- Caractérisation des résidus glycosidiques

La caractérisation des résidus glycosidiques des polysaccharides, est réalisée par GC-MS après hydrolyse et triméthylsilylation, puis confirmée par HPAEC-PAD. Le rendement d'hydrolyse est très dépendant des conditions opératoires. La stabilité des monosaccharides libres en solution nécessite la mise au point de conditions optimales d'hydrolyse pour chaque extrait de polysaccharides.

#### II.4.1.1.- Optimisation des conditions d'hydrolyse

Les conditions optimales d'hydrolyse, sont notées par le nombre maximum de taches qui correspond aux oses simples, avec moins de dégradation et d'alternance qui apparait sous forme de trainées au CCM avec augmentation des taux de composés furfuraliques.

##### II.4.1.1.1.- Suivi d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles par CCM

Le suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 0,5M, 2M et 4M a été mené pour une durée de 5 heures à 80°C et à 100°C, pour 2 systèmes chromatographiques. Le système 1 pour le suivi de l'apparition et ou la disparition des oligosaccharides (MEZZETI *et al.*, 1971) et le système 2 pour le suivi de l'altération des oses simples (RUIZ, 2005). Les différentes conditions d'hydrolyse sont discutées selon les rapports frontaux des spots des hydrolysats des polysaccharides.

###### II.4.1.1.1.1.- Hydrolyse par le système 1 (par CCM)

L'hydrolysat des polysaccharides hydrosolubles issus des différentes plantes dans divers conditions d'hydrolyse, sont soumis à l'analyse dans les conditions du système 1 par CCM.

###### II.4.1.1.1.1.1.- *Astragalus armatus*

Le suivi de l'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles d'*Astragalus armatus* à 80°C et à 0,5M TFA (fig. 9a), montre à 30mn 02 taches de  $R_f$  0,36 et 0,44. A 1h, 2

nouvelles taches de  $R_f$  0,05 et 0,12, puis à 2h des taches de  $R_f$  0,23 et 0,25, ont apparues (annexe 01). Elles deviennent 06 taches persistantes jusqu'à 5 heures avec une nouvelle tache de  $R_f$  à 0,47, qui semble représentée un ose simple selon les étalons (tableau 9). L'hydrolyse à 2M TFA et à 80°C (fig. 9c), augmente le nombre de tache jusqu'à 06 en 30mn et 1h. Après 2h, la tache de  $R_f$  0,52 apparaît, avec progression de l'intensité des taches de  $R_f$  0,02, 0,05, 0,11, 0,23, 0,37, 0,44, 0,52. A 4M TFA (fig. 9e), il s'observe 07 taches en 30mn. Elles persistent après 1h, 2h, 3h et de même après 4h d'hydrolyse. Ils ont comme  $R_f$  0,03, 0,07, 0,17, 0,32, 0,47, 0,53, 0,62. Cependant, après 5h d'hydrolyse, se remarque la disparition de la tache de  $R_f$  0,62.

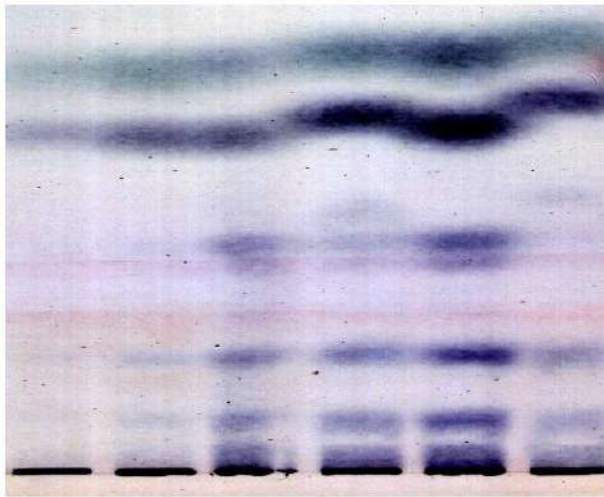
**Tableau 13.-**Rapport frontal ( $R_f$ ) des étalons des oses dans les deux systèmes de CCM

Type d'ose	Système 01	Système 02
Arabinose	0,42	0,48
Galactose	0,35	0,47
Glucose	0,40	0,38
Mannose	0,44	0,49
Xylose	0,62	0,56
Fructose	0,50	0,52
Acide glucuronique	0,26	0,42

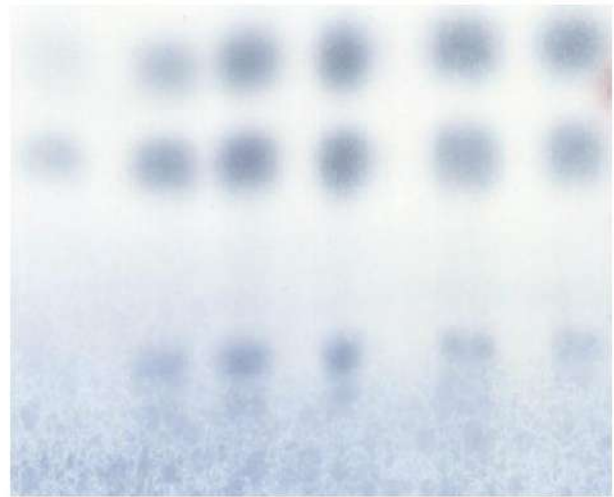
L'augmentation de la température à 100°C, montre que l'hydrolyse à 0,5M TFA pendant 30mn (fig.9b), donne 3 taches de  $R_f$  0,20, 0,33 et 0,39. Après 1h, la tache de  $R_f$  0,10, a apparue. De plus l'hydrolyse à 2M TFA à 100°C (fig.9d) a donné 6 taches de  $R_f$  0,06, 0,13, 0,27, 0,41, 0,47 et 0,56 en 30mn qui persistent après 1h. En 2h, il est remarqué la disparition de la tache de  $R_f$  0,06. A partir de 3h les taches de  $R_f$  0,14, 0,27, ont disparues. L'hydrolyse à 4M (fig.9f), montre 6 taches en 30mn. Après 2h, est remarquée la disparition des taches de  $R_f$  0,18, 0,23 et 0,60. A 5h, est notée la disparition de la tache de  $R_f$  0,15 avec diminution de l'intensité des taches de  $R_f$  0,43 et 0,50.

#### II.4.1.1.1.2.- *Plantago notata*

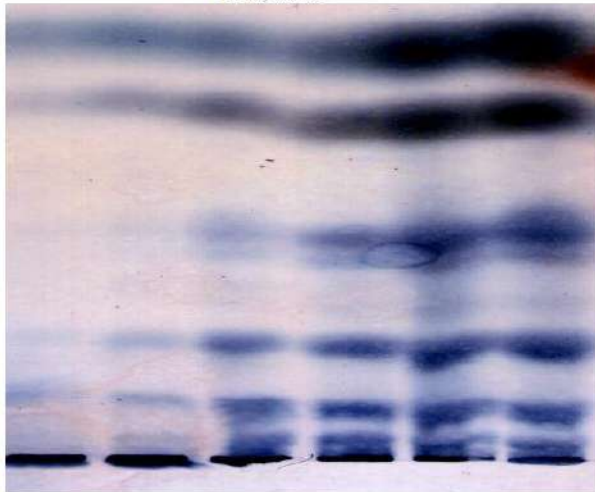
L'hydrolyse après 30mn des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* à 80°C et à 0,5M TFA (fig. 10a), laisse remarquer 3 taches de  $R_f$  0,44, 0,49, et 0,54.



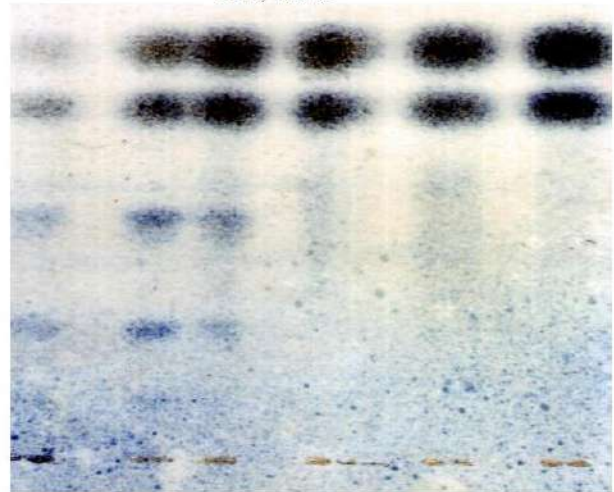
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 9a.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, 80°C



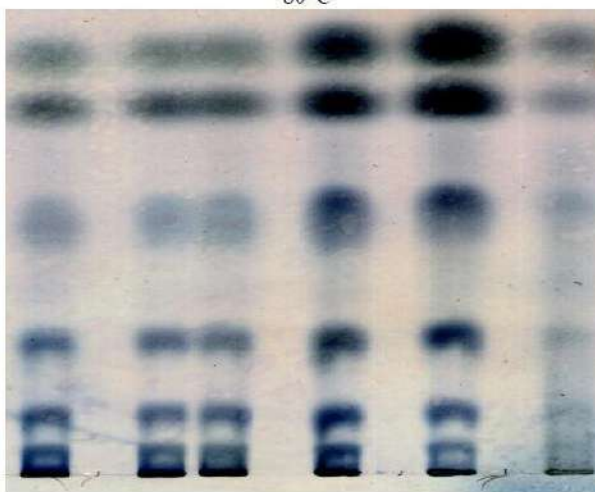
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 9b.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, 100°C



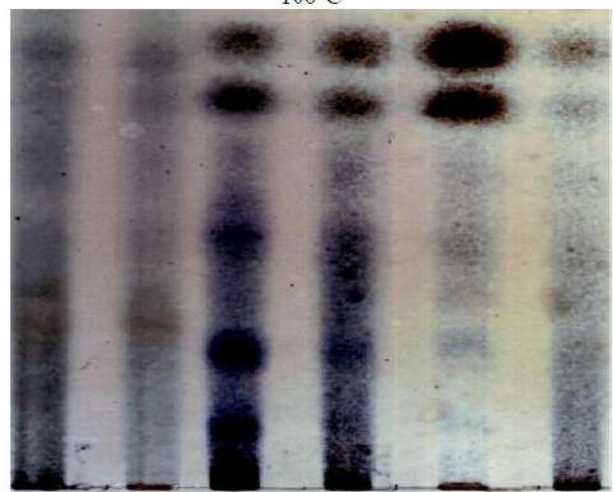
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 9c.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 9d.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, 100°C



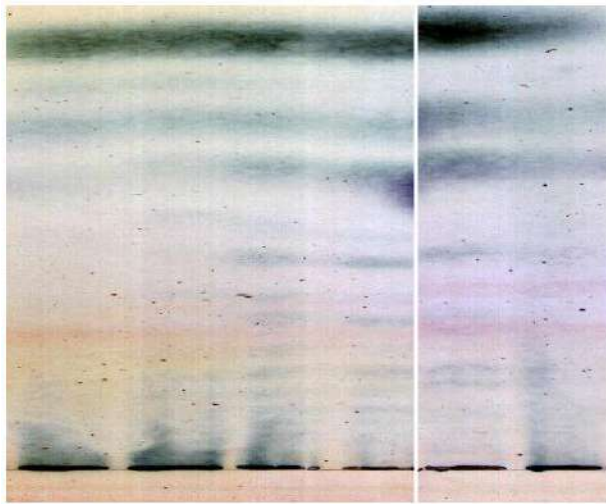
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 9e.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, 80°C



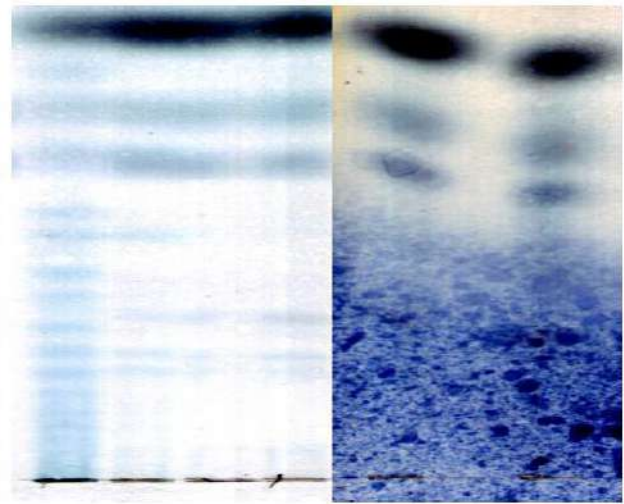
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 9f.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, 100°C

**Figure 9.-** Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides d'*A.armatus*, système 1

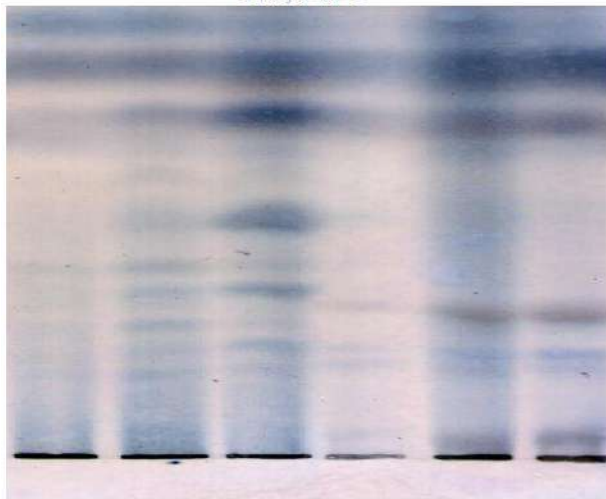




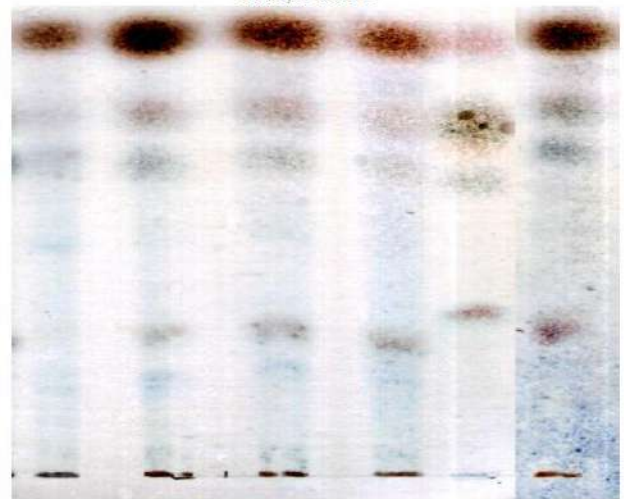
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 10a.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0,5M TFA, à 80°C



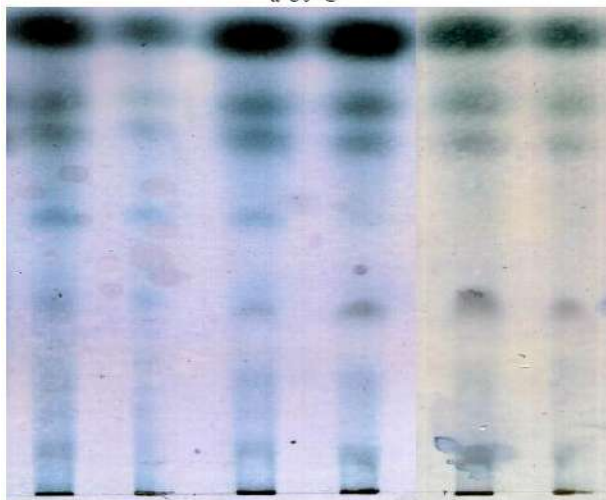
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 10b.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0,5M TFA, à 100°C



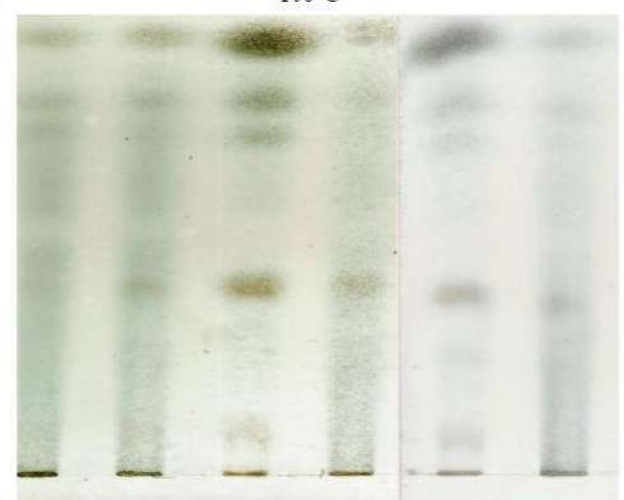
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 10c.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 10d.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 100°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 10 (e) -** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 10 (f) -** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 100°C

**Figure 10.-** Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides de *P.notata*, système 1



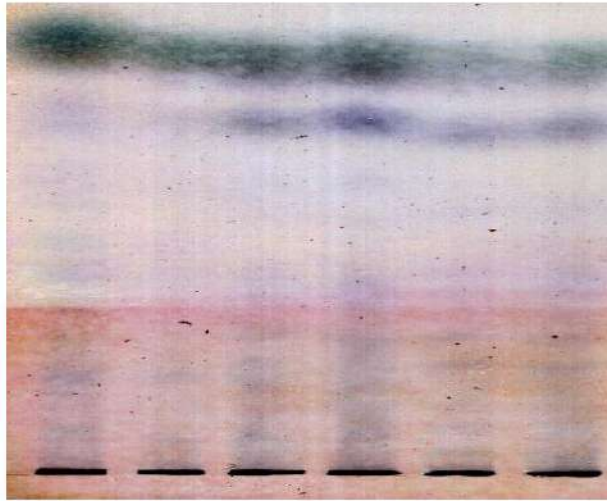
Après 1h des nouvelles taches de R<sub>f</sub> 0,11, 0,18, 0,21, 0,32, et 0,39, apparaissent (annexe 03). Au-delà de 5h, la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,18 et 0,49, est perceptible. L'hydrolyse à 2M TFA pendant 30mn montre 9 taches de R<sub>f</sub> 0,02, 0,09, 0,14, 0,18, 0,21, 0,37, 0,42, 0,47, et 0,53 (fig. 10c), et 10 taches en 1h et puis 2h. 3h après, il est remarqué la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,18, 0,21, et 0,25. Le suivi d'hydrolyse avec 4M TFA à 80°C (fig.10e) montre 6 taches en 30min, mais dans 2h est signalé l'apparition d'une nouvelle tache de R<sub>f</sub> 0,15 avec diminution de l'intensité de la tache de R<sub>f</sub> 0,37.

Le suivi d'hydrolyse des polysaccharides de *Plantago notata* à 100°C et à 0,5M TFA (fig. 10b) montre 14 taches de R<sub>f</sub> 0,06, 0,09, 0,10, 0,13, 0,16, 0,20, 0,24, 0,26, 0,31, 0,34, 0,40, 0,48, 0,52, et 0,58 en 30mn.

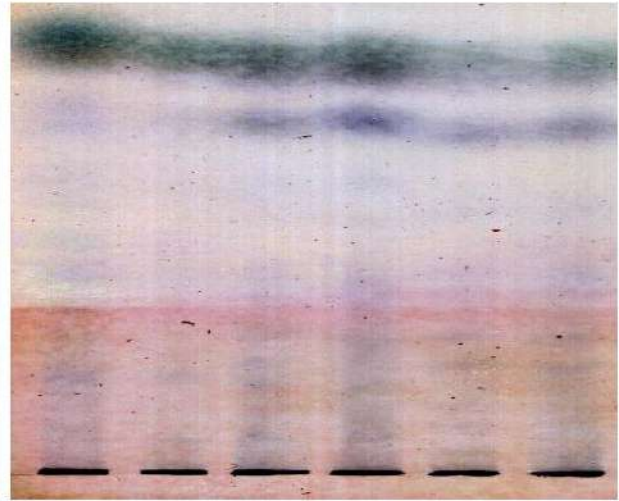
Après 1h d'hydrolyse, est observé la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,06, 0,09, 0,10, 0,24, 0,26, 0,34, et 0,52 qui semblent être des oligosaccharides. L'hydrolyse après 2h montre la disparition des taches, dont celle de R<sub>f</sub> 0,31. L'hydrolyse à 2M TFA et à 100°C (fig. 10d) montre 3 taches après 30mn, et après 1h, apparaît des taches de R<sub>f</sub> 0,12 et 0,18. A partir de 4h la tache de R<sub>f</sub> 0,12, n'est plus perceptible. L'hydrolyse à 4M TFA à 100°C pour le système 01 (fig. 10f), à 30mn montre 8 taches de R<sub>f</sub> 0,06, 0,29, 0,34, 0,41, 0,46, 0,52, 0,57, 0,67. Après 2h, les taches de R<sub>f</sub> 0,34 et 0,41, disparaissent, puis en 3h la tache de R<sub>f</sub> 0,52 n'apparaît plus. Elle est suivie d'une diminution de l'intensité des taches de R<sub>f</sub> 0,67, 0,57, et 0,52. L'hydrolyse à 4 h et à 5h montre la dégradation de la tache de R<sub>f</sub> 0,04 et la diminution de l'intensité de la tache de R<sub>f</sub> 0,60.

#### **II.4.1.1.1.1.3.- *Urginea noctiflora***

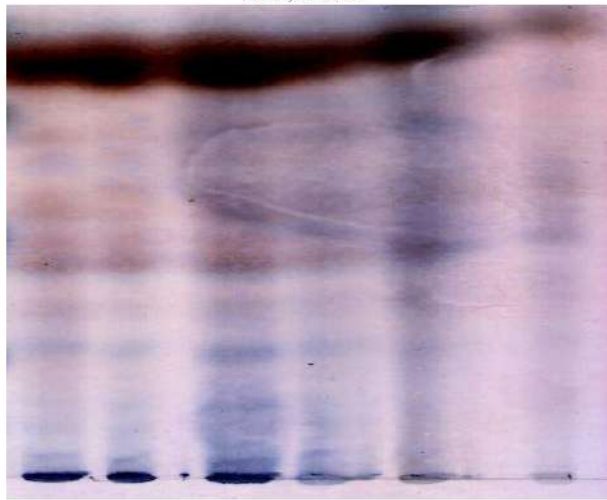
L'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles d'*Urginea noctiflora* à 0,5M TFA et à 80°C, donne 5 taches en 30mn. Après 1h, puis 2h, il est noté des R<sub>f</sub> 0,17, 0,25, 0,30, 0,36 et 0,40 (fig. 11a). Ce nombre chute à 04 spots. Au-delà de 3h et à 4h d'hydrolyse, disparaît la tache de R<sub>f</sub> 0,25 (annexe 05). Mais à 5h, se remarque l'apparition de 2 nouveaux spots de R<sub>f</sub> 0,54, 0,67, 0,74. Pour l'hydrolyse à 2M TFA (fig. 11c), la dégradation des taches est proportionnelle au temps, dont à 30mn et à 1h est noté 9 taches de R<sub>f</sub> 0,12, 0,16, 0,21, 0,23, 0,25, 0,28, 0,30, 0,34 et 0,42. En 2h, il est remarqué la disparition de 2 taches, et l'apparition de nouvelle tache après 3h.



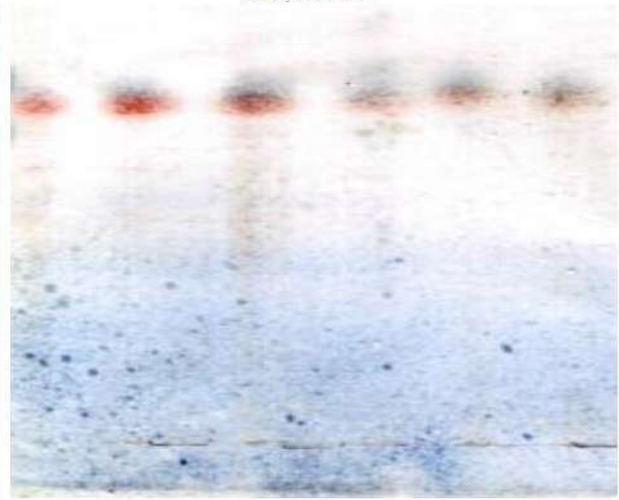
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 11a.** - Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, à 80°C



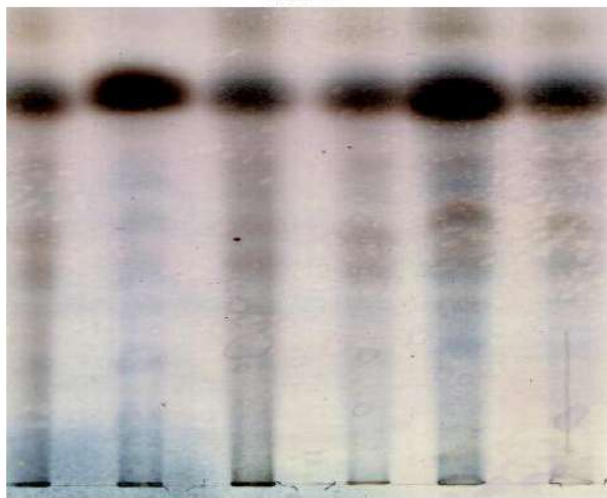
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 11b.** - Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, à 100°C



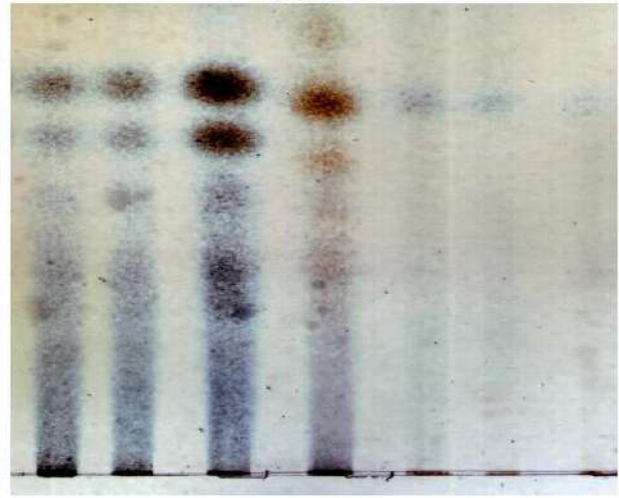
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 11c.** - Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 11d.** - Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 100°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 11e.** - Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 11f.** - Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 100°C

**Figure 11.**- Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d'*U. noctiflora*, système 1

Enfin après 5h, sont restées 3 taches. Pour l'hydrolyse à 4M TFA (fig. 11e) à 30mn, 1h, 2h, il est noté 4 taches de  $R_f$  0,28, 0,32, 0,50 et 0,59. A 3h la tache de  $R_f$  0,32, a apparu. Sont observées deux nouvelles taches de  $R_f$  0,23 et 0,35 à 4h. Elles disparaissent à 5h.

L'hydrolyse à 100°C avec 0,5M TFA (fig. 11b), est stable dans le temps. Il est remarqué 3 taches de même  $R_f$  0,23, 0,29, 0,37 avec diminution de l'intensité des taches en 4h et en 5h d'hydrolyse. Mais avec 2M TFA et à 100°C (fig. 11d), l'hydrolyse dans le temps, a donné une seule tache de même  $R_f$  0,48. A 4M TFA (fig. 11f), l'hydrolyse à 30mn permet d'observer 05 taches et dans 2h, il est remarqué l'apparition de la tache de  $R_f$  0,58 et après 3h. Il reste une seule tache de  $R_f$  0,50, à cause de la disparition des taches de  $R_f$  0,21, 0,26, 0,37, 0,43, 0,58 qui se dégradent totalement avec diminution de l'intensité de la tache de  $R_f$  0,50.

#### II.4.1.1.1.4.- *Asphodelus tenuifolius*

Le suivi d'hydrolyse à 80°C et à 0,5M TFA (fig. 12 a) montre que le nombre des taches augmente dans le temps, dont à 30mn il se remarque l'apparition de 2 taches de  $R_f$  0,44 et 0,49, ensuite 9 taches après 1h, et 10 taches à partir de 2h (annexe 01). Ainsi, il se remarque la condensation de la tache de  $R_f$  0,49 qui semble représentée un ose simple selon les  $R_f$  des étalons (tableau 13), et la diminution de l'intensité de la tache du  $R_f$  0,53. L'augmentation de la concentration de l'acide TFA à 2M permet d'observer 6 taches durant tout le temps d'hydrolyse (fig. 12c). L'hydrolyse à 4M TFA et à 80°C montre l'apparition de 9 taches dès les 30mn, qui persistent pendant 2h, mais la disparition de la tache de  $R_f$  0,06 se remarque, et la condensation de celle de  $R_f$  0,52 après 3h d'hydrolyse (fig. 12e).

L'hydrolyse à 0,5M TFA et à une température de 100°C permet d'observer 4 taches en 30 mn. Après une heure d'hydrolyse, il est noté l'apparition de nouvelles taches avec des  $R_f$  respectifs de 0,25, 0,35, et 0,57, qui persiste jusqu'à 5heures (fig. 12b). Une heure d'hydrolyse, est suffisante car elle est efficace, au vu du nombre de spots. Tandis que, l'hydrolyse à 2M TFA et à 100°C (fig. 12d) permet d'obtenir 7 taches en 30mn (annexe 02). La tache de  $R_f$  0,06 qui semble être un oligosaccharide, disparaît après 2h. Il ne reste que 6 taches.

La figure 12f, est le résultat de l'hydrolyse à 4M TFA et à 100°C. Après 30mn d'hydrolyse, 7 taches se remarquent, et après 1h la tache de  $R_f$  0,06, disparaît.

#### II.4.1.1.1.2.- Suivi d'hydrolyse par le système 2 par CCM

##### II.4.1.1.1.2.1.- *Astragalus armatus*

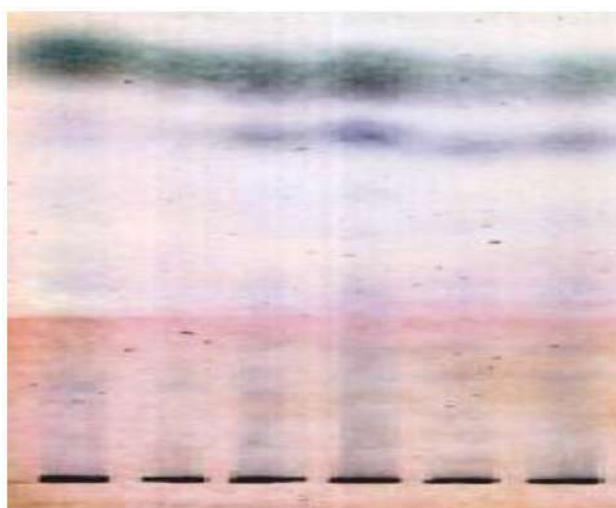
L'hydrolyse à 0,5M TFA et à 80°C (fig. 13a) permet d'observer en 30mn 6 taches de R<sub>f</sub> 0,11, 0,16, 0,23, 0,31, 0,43, 0,52 qui persistent jusqu'à 5h (annexe 02). Mais l'hydrolyse à 2M et à 30mn (fig. 13c), permet d'observer 5 taches de R<sub>f</sub> 0,14, 0,17, 0,25, 0,46 et 0,56. Ainsi à 5h, des nouvelles taches de R<sub>f</sub> 0,11, 0,30, 0,40, sont notées avec dégradations des taches de R<sub>f</sub> 0,14 et 0,34. L'hydrolyse à 4M TFA (fig. 13e) permet d'observer 08 taches en 30mn. Après une heure est remarquée la disparition de la tache de R<sub>f</sub> 0,03 et la tache de R<sub>f</sub> 0,60, est observée. En 3h la tache de R<sub>f</sub> 0,07, s'est dégradée.

L'hydrolyse à 100°C et à 0,5M TFA (fig. 13b), montre 7 taches de R<sub>f</sub> 0,03, 0,07, 0,13, 0,24, 0,35, 0,40, 0,48 à partir de 30 mn, qui deviennent 06 taches à 4h et à 5h, à cause de la disparition de la tache de R<sub>f</sub> 0,03. Les résultats d'hydrolyse à 2M TFA (fig. 13d), à 30mn donne 08 taches de R<sub>f</sub> 0,03, 0,09, 0,20, 0,26, 0,45, 0,50, 0,60 et 0,65 et après 1h d'hydrolyse, on note la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,20, 0,26, 0,65 avec apparition des taches de R<sub>f</sub> 0,18, 0,31. Après 3h d'hydrolyse, la tache de R<sub>f</sub> 0,36, a apparue. En revanche, après 4h, les taches de R<sub>f</sub> 0,03, 0,09, 0,18, ont disparu. A 5h, se remarque la diminution de l'intensité des taches de R<sub>f</sub> 0,31 et 0,36. L'hydrolyse à 4M TFA et à 100°C (fig. 13f) à 30mn permet d'obtenir 7 taches. Après 1h se remarque la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,35 et 0,42 avec apparition de la tache de R<sub>f</sub> 0,07, mais après 2h la tache de R<sub>f</sub> 0,21 a disparu et la tache de R<sub>f</sub> 0,13 a apparue. En 5 heures les taches de R<sub>f</sub> 0,07, 0,28 et 0,63, ont disparu avec diminution de l'intensité des taches de R<sub>f</sub> 0,48 et 0,54.

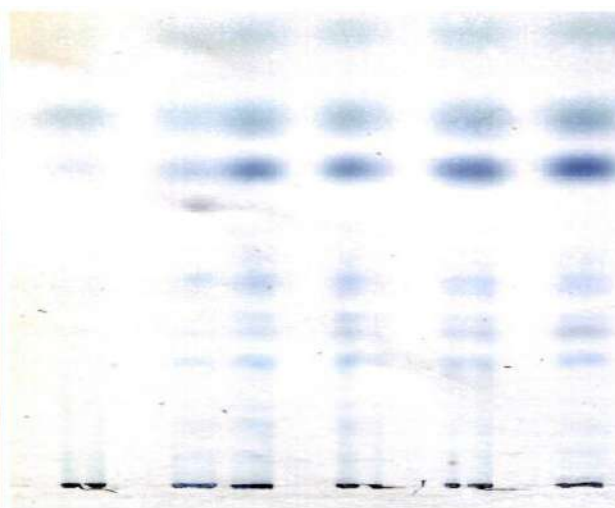
##### II.4.1.1.1.2.2.- *Plantago notata*

L'hydrolyse à 0,5M TFA et à 80°C (fig. 14a) montre une augmentation du nombre de tache dans le temps, 2 taches de R<sub>f</sub> 0,48 et 0,53 pendant 1h, 5 taches après 2h, 8 taches après 3h. Au-delà de 5h, se remarque la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,13 et 0,37 (annexe 04). L'hydrolyse à 2M à 80°C (fig. 14c) donne 07 taches à 30mn et 12 taches en 2h. Après 3h, il est observé la disparition des taches de R<sub>f</sub> 0,21, 0,32, et 0,38 et l'apparition de la tache de R<sub>f</sub> 0,35. À 4M TFA (fig. 14e), est apparue 08 taches en 30mn, qui persistent après 1h, 2h, 3h, et 4h, mais à 5h, se remarque la disparition de la tache de R<sub>f</sub> 0,06.

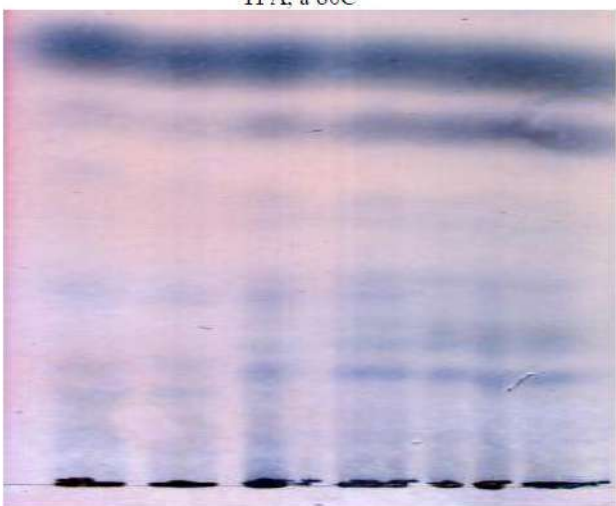




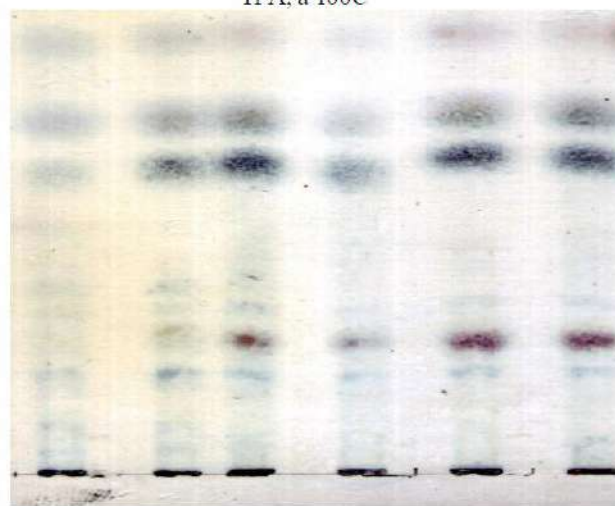
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 12a.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0,5M TFA, à 80°C°



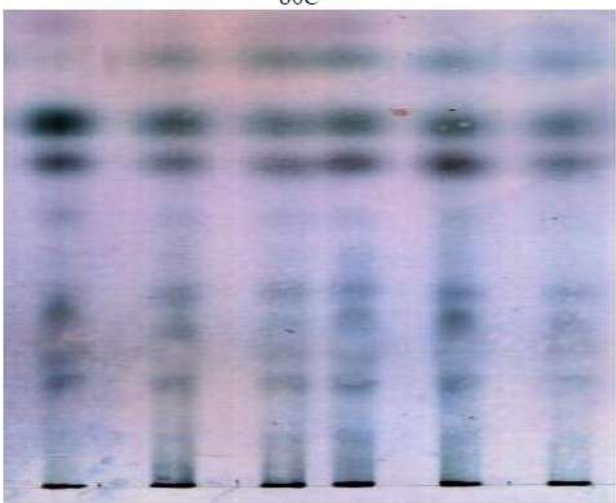
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 12b.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0,5M TFA, à 100°C°



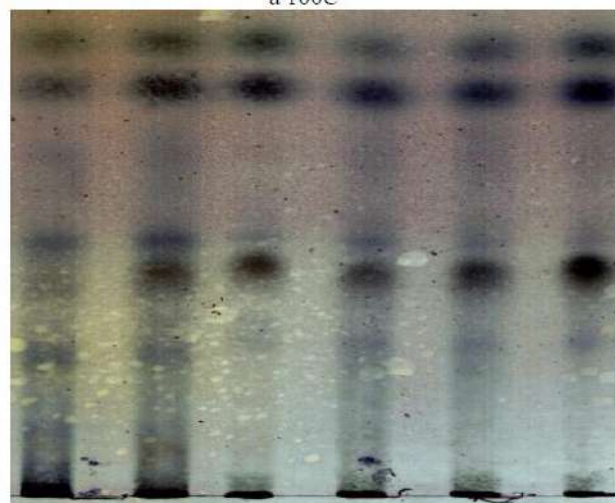
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 12c.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 80°C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 12d.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 100°C°

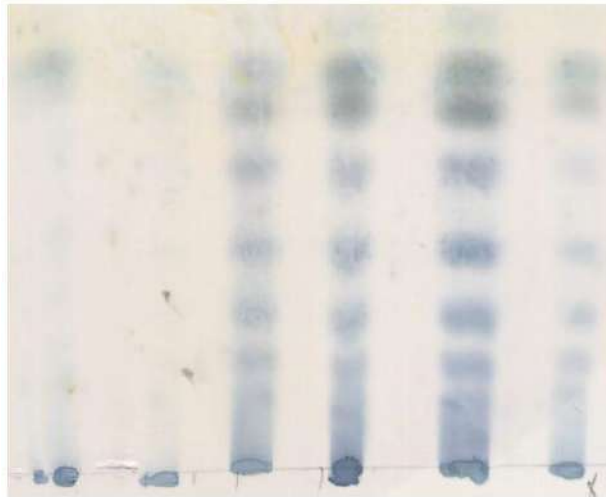


30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 12e.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 80°C°

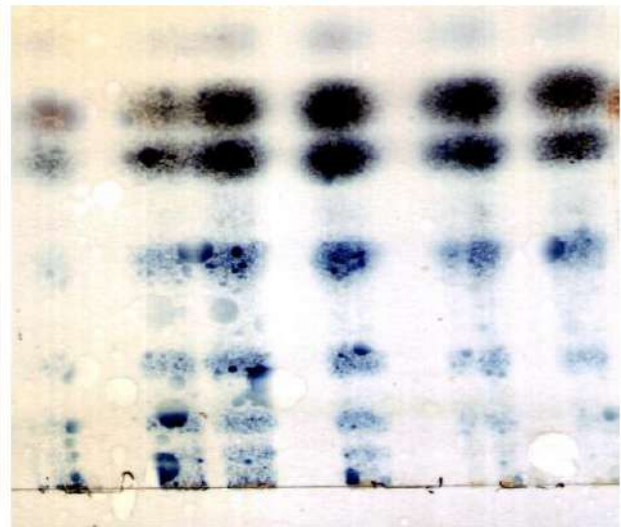


30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 12f.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 100°C°

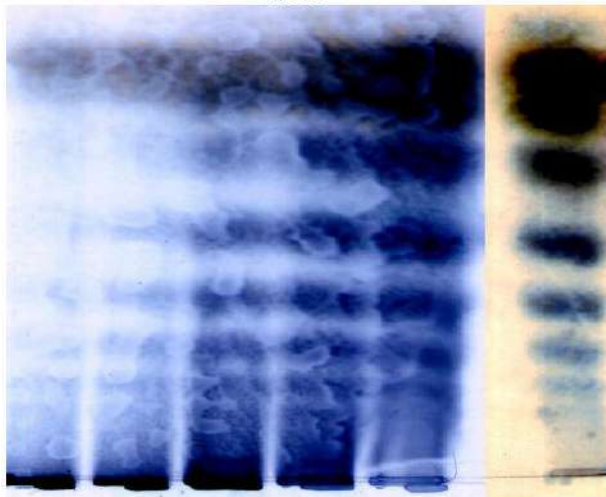
**Figure 12.-** Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d'*A. tenuifolius*, système 1



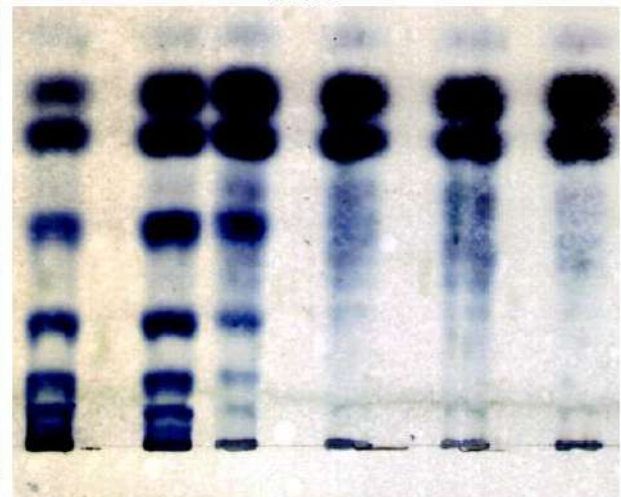
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 13 (a)** - Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, à 80C°



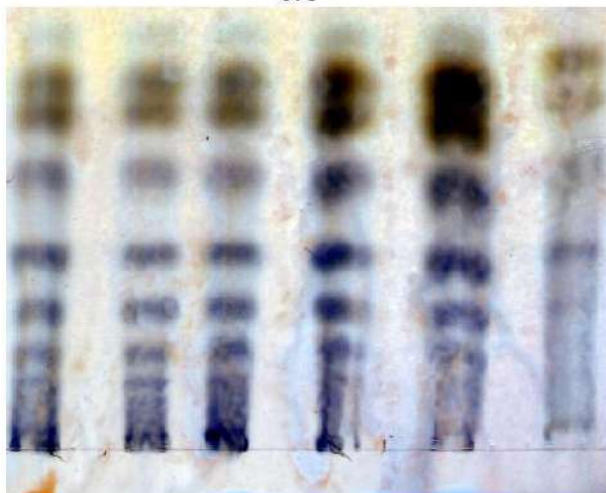
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 13 (b)** - Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, à 100C°



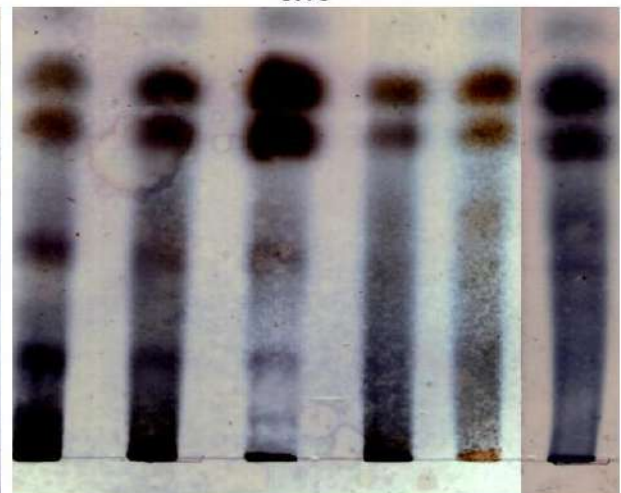
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 13 (c)** - Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 80C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 13 (d)** - Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 100C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 13 (e)** - CCM des hydrolysats à 4M TFA, à 80C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 13 (f)** - CCM des hydrolysats à 4M TFA, à 100C°

**Figure 13** - Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides d'*A.armatus*, système 2

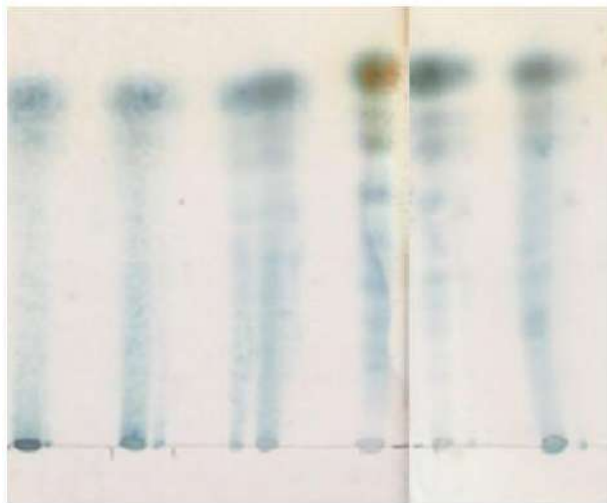


Le suivi d'hydrolyse à 100°C et à 0,5M TFA (fig. 14b) montre 12 taches de  $R_f$  0,07, 0,10, 0,13, 0,17, 0,21, 0,25, 0,32, 0,35, 0,42, 0,47, 0,50 et 0,56 à 30mn et après 1h est remarqué la disparition des taches de  $R_f$  0,10, 0,13, 0,17, 0,21, 0,35 et 0,50. De même, à 2h la tache de  $R_f$  0,32, disparaît. L'hydrolyse à 2M TFA et à 100°C (fig. 14d) donne 5 taches à partir de 30mn. Après 4h d'hydrolyse, les taches de  $R_f$  0,06 et 0,18, disparaissent. Toutefois, la tache de  $R_f$  0,33, n'apparaît qu'après 5h d'hydrolyse, de même que les taches de  $R_f$  0,33, 0,44, et 0,58, avec condensation de la tache de  $R_f$  0,65. Enfin, l'hydrolyse à 4M TFA (fig. 14f) donne 4 taches à 30mn et en 1h est remarquée l'apparition de la tache de  $R_f$  0,30. Pour l'hydrolyse à 2h, il est observé de nouvelles taches de  $R_f$  0,11 et 0,23. L'hydrolyse après 4h laisse apparaître une nouvelle tache de  $R_f$  0,63.

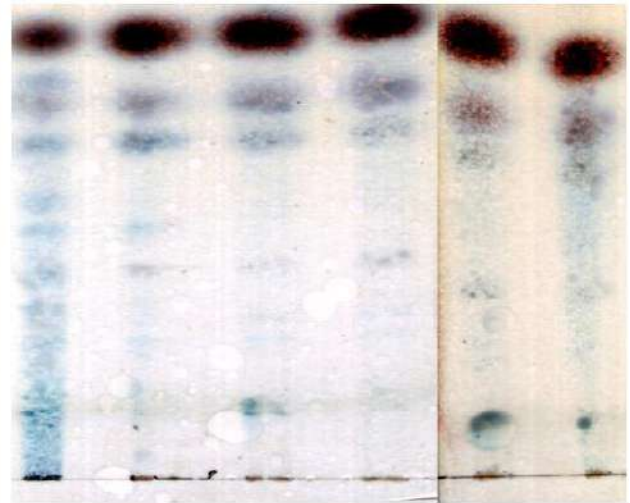
#### II.4.1.1.1.2.3.- *Urginea noctiflora*

Le suivi d'hydrolyse à 80°C avec 0,5M TFA (fig. 15a) en 30mn permet d'obtenir 4 taches de  $R_f$  0,25, 0,33, 0,38, 0,48. Après 1h, il n'est resté qu'une seule tache de  $R_f$  0,48. Mais en 2h, sont remarquées 3 taches avec apparition de 2 nouvelles taches de  $R_f$  0,12 et 0,16 (annexe 06). Pour 3h, elles deviennent 05 taches avec apparition des spots de  $R_f$  0,21 et 0,25. En 5h, les taches sont sous formes de trainées et, il ne reste qu'une seule tache de  $R_f$  0,48. A 2M TFA (fig. 15c), sont observées 4 taches en 30mn et, en 1h se remarque la disparition de la tache de  $R_f$  0,34 et en 2h l'apparition des taches de  $R_f$  0,23 et 0,61. Puis en 3h, est notée la disparition de la tache de  $R_f$  0,23. A 5h, il reste seulement 3 taches, après la disparition de la tache de  $R_f$  0,40. Pour l'hydrolyse à 4M TFA (fig. 15e) à 30mn, est remarquée 05 taches qui évoluent à 06 taches en 1h. A 4h est remarquée la disparition de la tache de  $R_f$  0,65 et apparition des taches de  $R_f$  0,62, 0,67. Il est noté la disparition des taches de  $R_f$  0,30, 0,40, 0,67, à 5h d'hydrolyse.

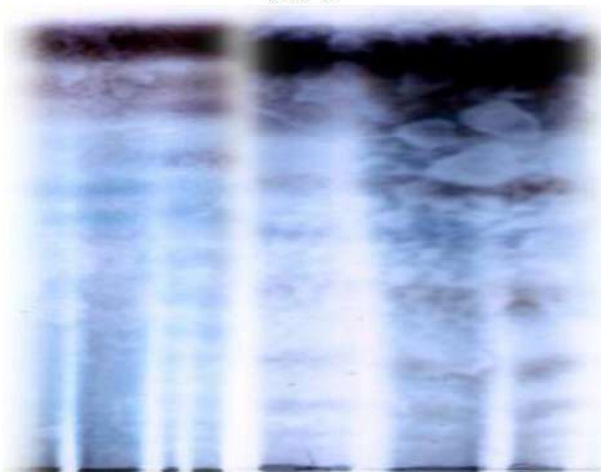
L'hydrolyse à 100°C et à 0,5M TFA (fig. 15b) laisse apparaître en 30mn 4 taches qui vont se dégrader à 4h et 5h d'hydrolyse. Pour l'hydrolyse à 2M TFA à 100°C (fig. 15d), à 30mn, se remarque 4 taches. Après 2h la tache de  $R_f$  0,54, est apparue et à partir de 3h. La disparition de la tache de  $R_f$  0,38 et apparition de la tache de  $R_f$  0,43, sont observées. Les résultats d'hydrolyse à 4M TFA et à 100°C (fig. 15f), montrent 6 taches en 30mn. Après 1h, il y a disparition des taches de  $R_f$  0,15 et 0,61, et apparition des taches de  $R_f$  0,13, 0,18, 0,63, 0,73. Après 2 h d'hydrolyse, toutes les taches précédentes disparaissent, seule la tache de  $R_f$  0,63, persiste.



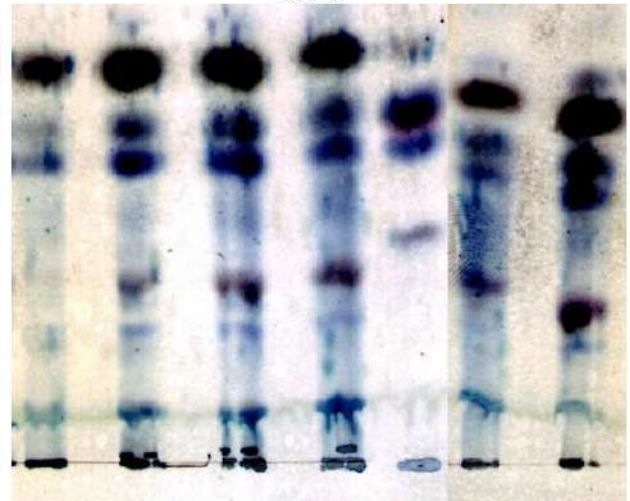
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 14 (a)** - Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, à 80°C



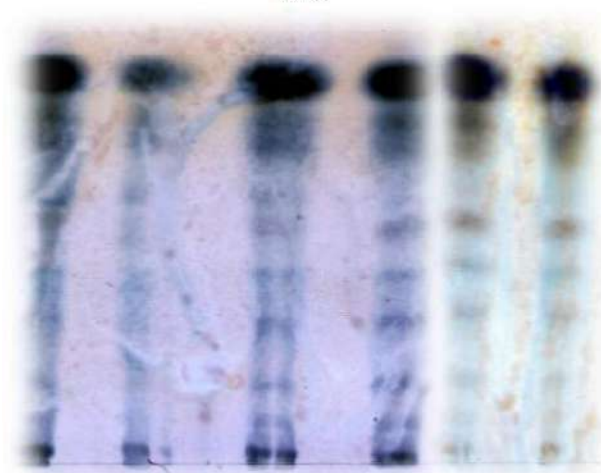
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 14 (b)** - Chromatogramme d'hydrolysats à 0.5M TFA, 100°C



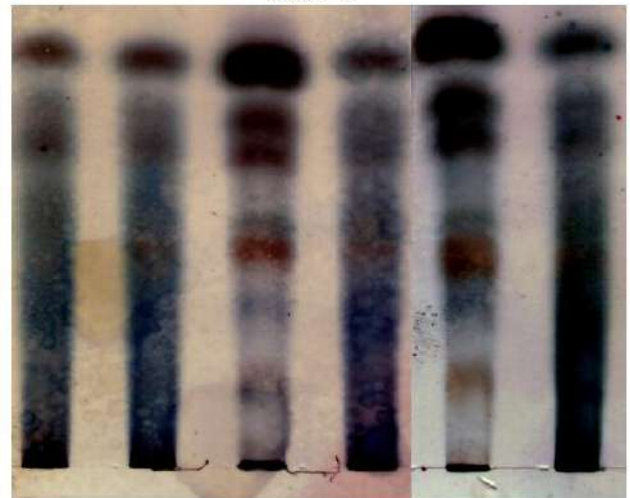
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 14 (c)** - Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 14 (d)** - Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 100°C



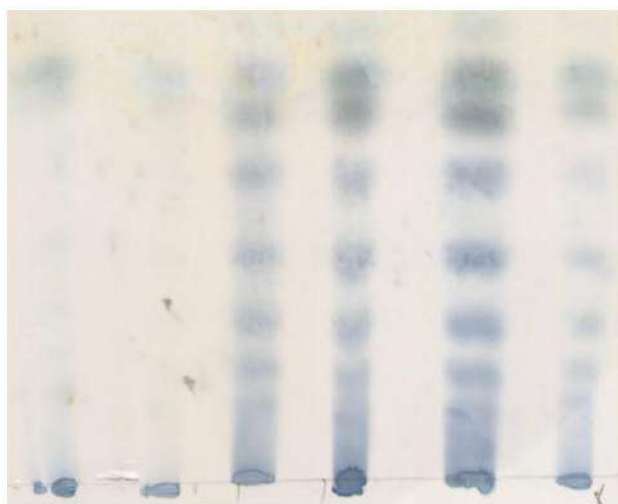
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 14 (e)** - Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 80°C



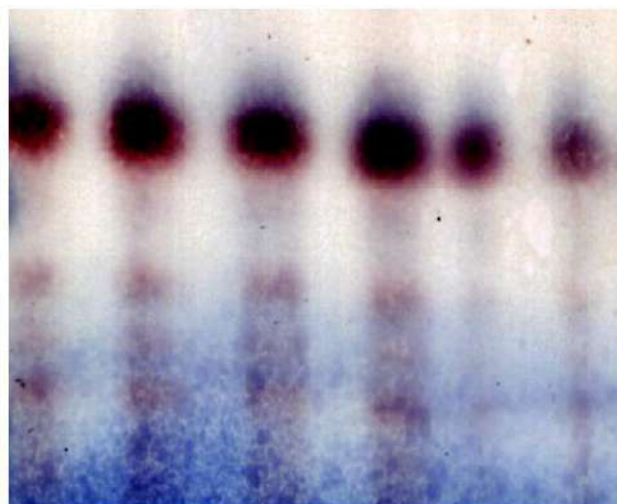
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Fig. 14 (f)** - Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 100°C

**Figure 14** - Chromatogrammes des hydrolysats des polysaccharides de *P. notata*, système 2

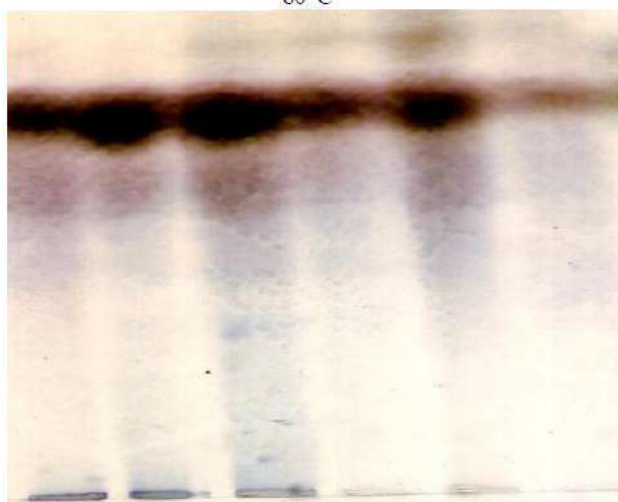




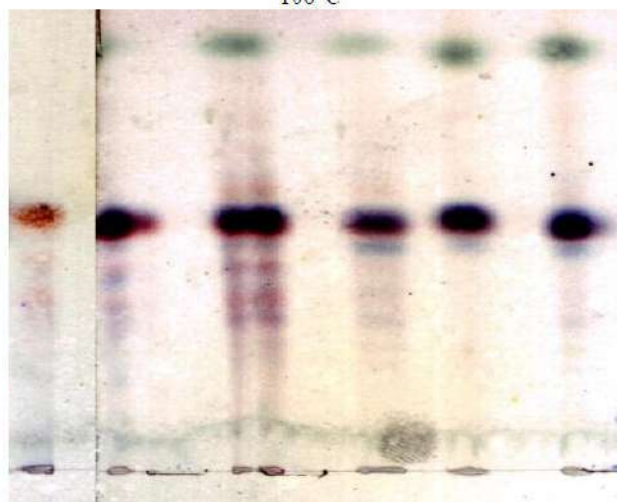
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 15a.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0,5M TFA, 80°C



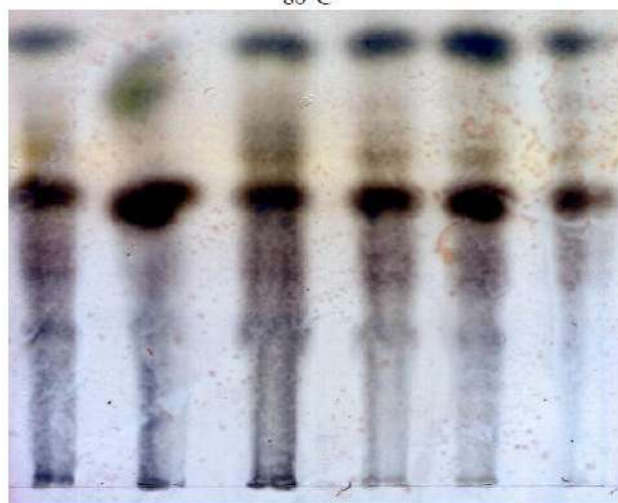
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 15b.-** Chromatogramme d'hydrolysats, à 0,5M TFA, 100°C



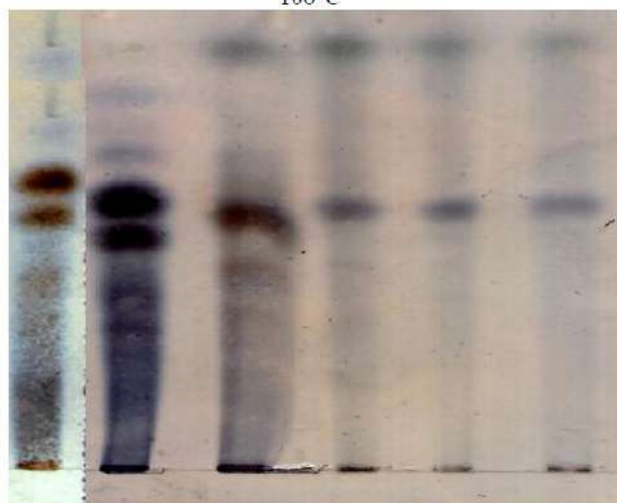
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 15c.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 15d.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, 100°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 15e.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, 80°C



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 15f.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, 100°C

**Figure 15.-** Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d'*U. noctiflora*, système 2

De même, de nouvelles taches, apparaissent de  $R_f$  0,31, 0,41, 0,49, 0,57. A partir de 3h, les taches de  $R_f$  0,31, 0,41, 0,49, 0,57, 0,63, ont disparu et la tache de  $R_f$  0,52, apparaît.

#### **II.4.1.1.1.2.4.- *Asphodelus tenuifolius***

Parallèlement, le système 02, à 80°C et à 0,5 M TFA (fig. 16a), donne moins de taches par rapport au système 1. A 30mn, il est remarqué une seule tache de  $R_f$  0,48 et à 2 h, 5 taches de  $R_f$  0,23, 0,36, 0,48, 0,53, et 0,61. La disparition des taches après 3h, puis à 4h, et à 5h, est notée. L'hydrolyse à 2M (fig. 16c), montre 5 taches à 30min. Ce nombre atteint 10 taches en une heure d'hydrolyse et persiste jusqu'à 5heures. A 4M TFA (fig. 16e), est remarqué 07 taches de 30mn jusqu'à 5h, de  $R_f$  0,18, 0,27, 0,31, 0,40, 0,53, 0,55 et 0,64. La condensation des taches de  $R_f$  0,53 et 0,55, est perceptible. A cet effet, il faut signaler que l'hydrolyse à 30mn, est suffisante pour la libération des oses simples.

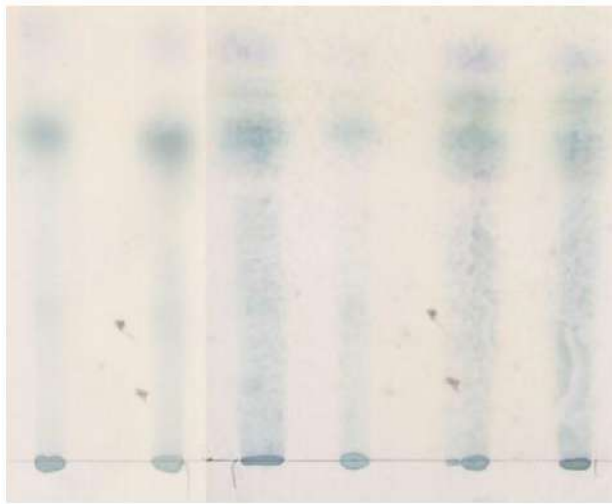
L'hydrolyse à 0,5M TFA et à 100°C (fig. 16b) donne en 30mn puis à 1h l'apparition de 2 taches de  $R_f$  0,44 et 0,48. L'hydrolyse à 2h laisse remarquer l'apparition des nouvelles taches de  $R_f$  0,08, 0,26, et 0,42. Toutefois, la tache de  $R_f$  0,44, se dégrade. L'augmentation de la concentration d'acide à 2M TFA (fig. 16d) à 30mn, donne 05 taches de  $R_f$  0,12, 0,21, 0,37, 0,53, et 0,59, puis après 1h la tache de  $R_f$  0,12, disparaît. Après 3h la tache de  $R_f$  0,43, apparaît. Après 4h d'hydrolyse, il se remarque l'apparition de la tache de  $R_f$  0,16. À 4M TFA (fig. 16f), il est observé 7 taches dans le temps d'hydrolyse. L'hydrolyse pendant 30mn, semble suffisante.

#### **II.4.1.1.2.- CCM des étalons**

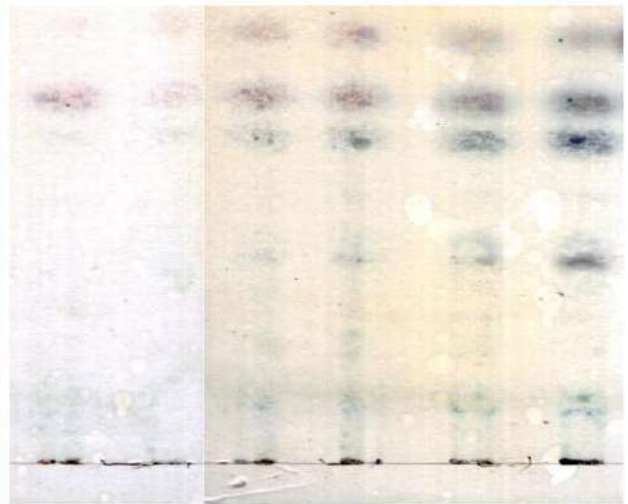
La détermination des  $R_f$  d'oses étalons en différentes conditions d'hydrolyse, permet de suivre la libération des oses simples des polysaccharides à étudier (fig. 17). Elle permet de même, l'étude de leur altération, ainsi d'identifier partiellement les principaux oses constitutifs des différents extraits de polysaccharides hydrosolubles (tableau 13).

#### **II.4.1.1.6.- Dosage des composés furfuraliques par la méthode de DUBOIS**

Les concentrations en composés furfuraliques, sont déterminées par référence à une gamme étalon (fig. 18).



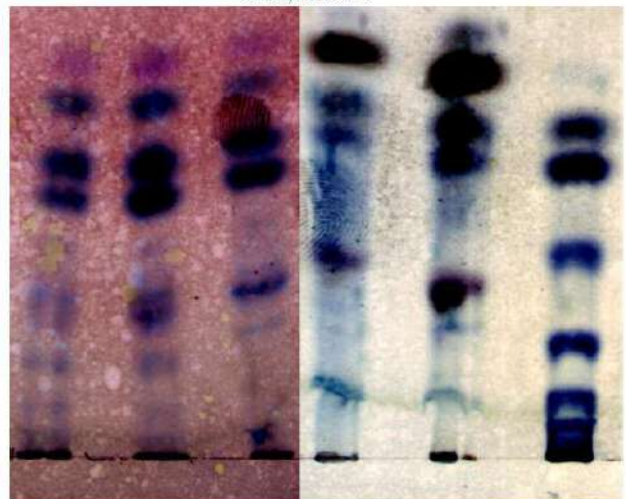
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 16a.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0,5M TFA, à 80°C°



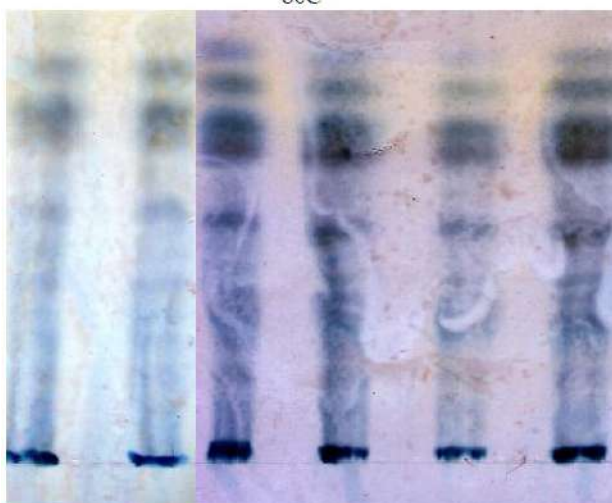
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 16b.-** Chromatogramme des hydrolysats à 0.5M TFA, à 100°C°



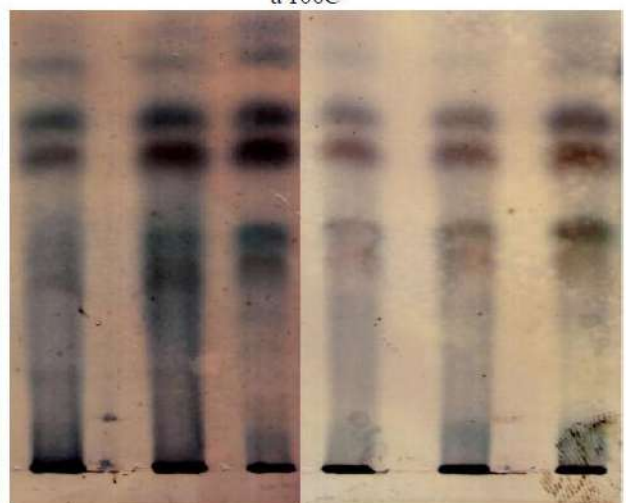
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 16c.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 80°C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 16.d.-** Chromatogramme des hydrolysats à 2M TFA, à 100°C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 16e.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 80°C°



30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 16f.-** Chromatogramme des hydrolysats à 4M TFA, à 100°C°

**Figure 16.-** Chromatogrammes d'hydrolysats des polysaccharides d'*A.tenuifolius*, système 2

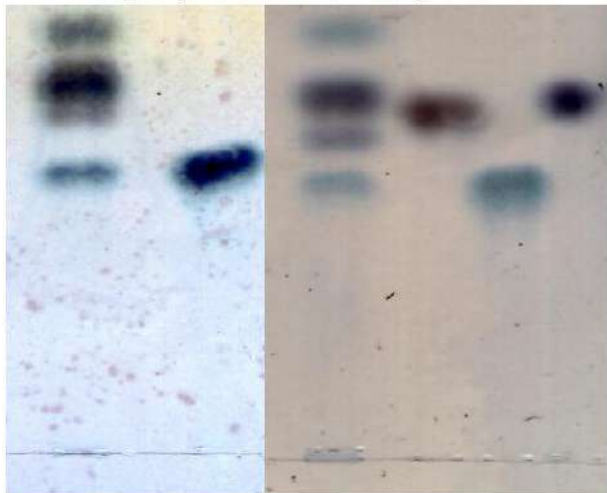




Gal Man Xyl Ara Glc Mélange  
**Figure 17a.-** Chromatogramme des étalons subissent à l'hydrolyse à 0,5M TFA, 80°C, système 1



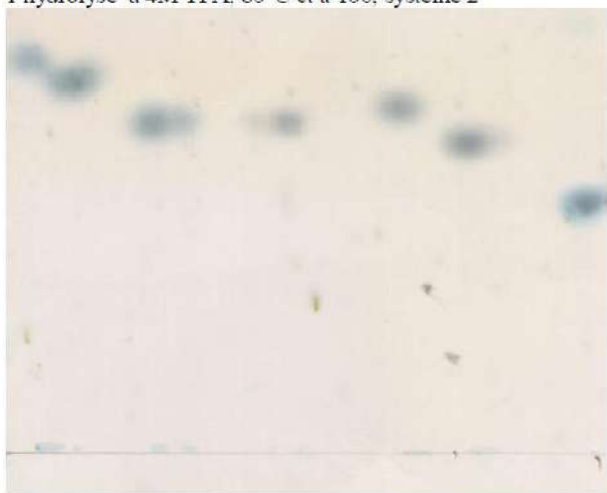
30mn 1h 2h 3h 4h 5h  
**Figure 17b.-** Chromatogramme des étalons subissent à l'hydrolyse à 2M TFA, 80°C, système 2



Mélange Glc.A Mélange Glc Glc.A Ara  
**Figure 17c.-** Chromatogramme des étalons subissent à l'hydrolyse à 4M TFA, 80°C et à 100, système 2



Mélange Fru Glc Man Ara  
**Figure 17d.-** Chromatogramme des étalons subissent à l'hydrolyse à 0,5M TFA, 100, système 2



Xyl Ara Glc Man Gal Fru Glc.A  
**Figure 17e.-** Chromatogramme des étalons, système 2

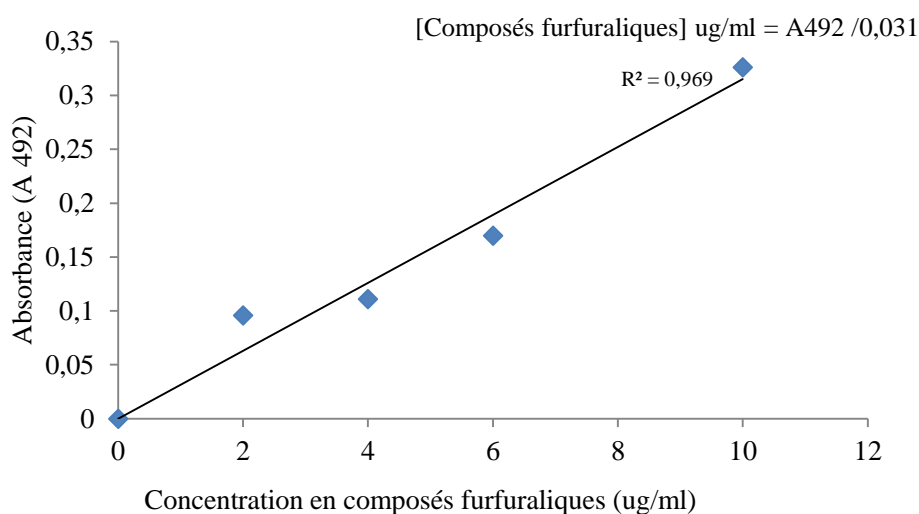


Glc A. Fru Man Xyl Glc Gal  
**Figure 17f.-** Chromatogramme des étalons dans le système 1

**Figure 17.-** Chromatogrammes des étalons

Au vu des figures 19a, b, c, d, e, et f représentant, le suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse, il se remarque une augmentation de la concentration en composés furfuraliques qui est proportionnelle aux temps, au degré d'acidité, et aux températures. L'apparition de ces composés, dépend du type de monosaccharides et du type de liaisons.

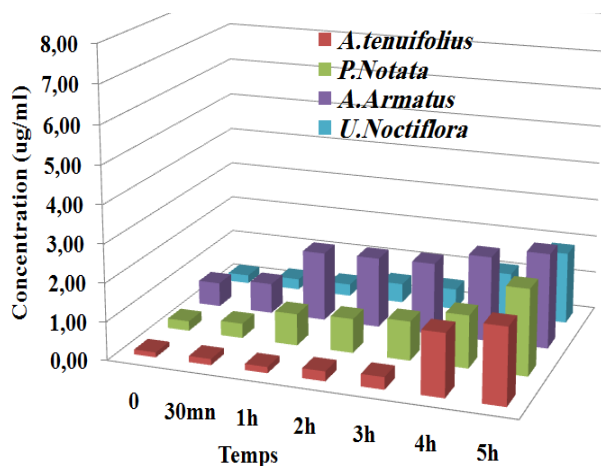
L'hydrolyse à 0.5M TFA et à 80°C (fig. 19a), laisse apparaitre une fluctuation des concentrations en composés furfuraliques à faible concentration. Elle ne dépasse pas 0,07mg/ml.



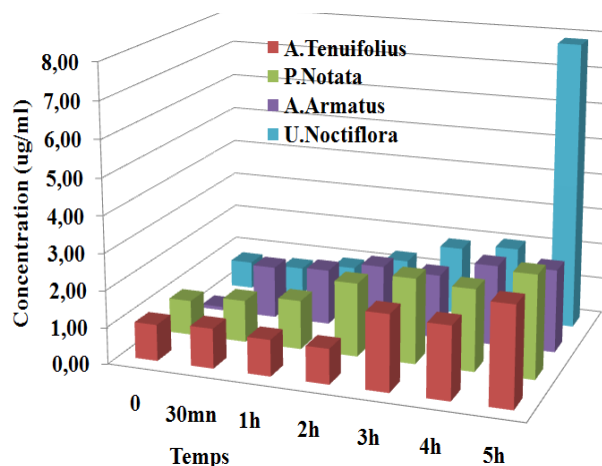
**Figure 18** -Courbe d'étalonnage des composés furfuraliques

L'hydrolyse à 0,5M TFA et à 100°C (fig. 19b), montre que la concentration des composés furfuraliques reste faible et stable entre 30mn et 3h. Mis à part pour l'hydrolysats des polysaccharides d'*Urginea noctiflora* pendant 5h qui produit une quantité appréciables en composés furfuraliques, soit 0,250mg/ml. Tous les hydrolysats donnent de faibles concentrations en composés furfuraliques qui restent inférieures à 0,1mg/ml. Les composés furfuraliques obtenues au cours de l'hydrolyse à 2M TFA à 80°C ou à 100°C (fig. 19c et 19d), permettent d'observer une augmentation de concentrations en composés furfuraliques pour les hydrolysats d'*Asphodelus tenuifolius* et d'*Urginea noctiflora*. Ils dépassent 0,1mg/ml à 4h.

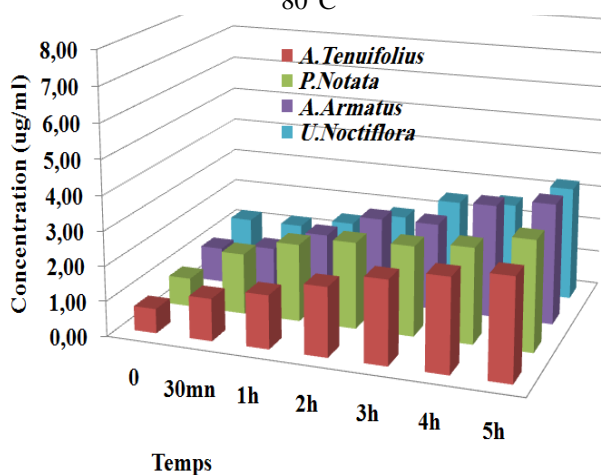
Pour l'hydrolyse à 4M TFA à 80°C ou à 100 (fig. 19e et 19f), la concentration des composés furfuraliques, est stable seulement pour les 30mn, car elle progresse dans le temps pour atteindre des maximum de 0,147mg/ml pour *Asphodelus tenuifolius*, 0,242mg/ml pour *Plantago notata* et 0,253 mg/ml pour *Urginea noctiflora*.



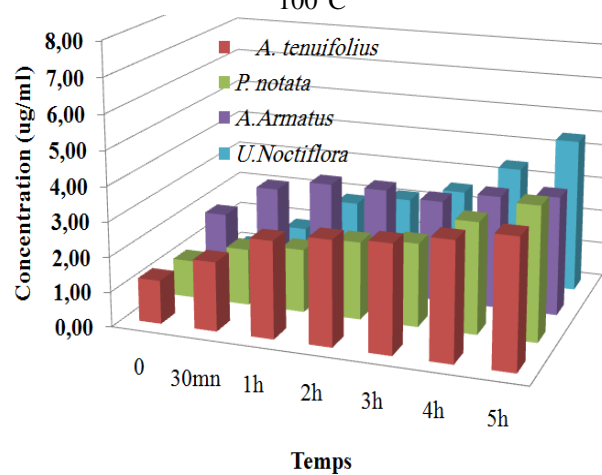
**Figure19a.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse à 0,5M TFA et à 80°C



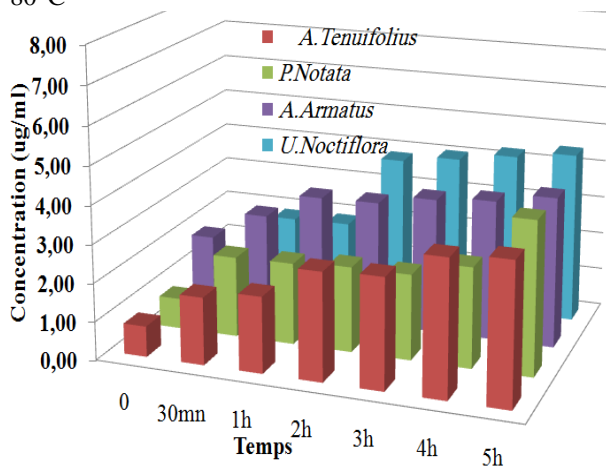
**Figure19b.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse à 0,5M TFA et à 100°C



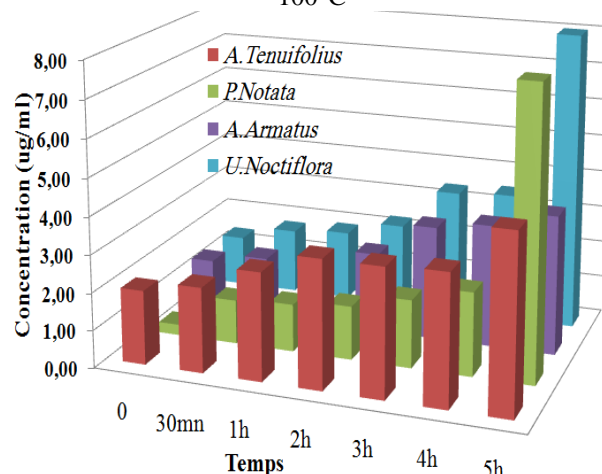
**Figure 19c.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse à 2M TFA et à 80°C



**Figure19d.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse à 2M TFA et à 100°C



**Figure19e.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse à 4M TFA et à 80°C



**Figure19f.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques au cours de l'hydrolyse à 4M TFA et à 100°C

**Figure19.-** Suivi de la formation des composés furfuraliques

L'étude des conditions optimales d'hydrolyse acide des polysaccharides hydrosolubles (température, concentration en acide, cinétique de la libération des oses), suivant deux systèmes de séparation par CCM et le dosage des composés furfuraliques, permettent une étude rapide, simple et moins laborieuse d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles des différentes parties des plantes étudiées, pour leur caractérisation par l'HPAEC-PAD et la GC/MS-EI.

Pour les polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*, il est remarqué que l'hydrolyse à 80°C et à 2M TFA pendant 1h permet la libération de 7 oses simples, avec 1,53ug/ml de composés furfuraliques. En comparaison avec les R<sub>f</sub> des étalons, les polysaccharides renferment de l'arabinose, du glucose, d'acide glucuronique et du mannose.

Les conditions optimales d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles des graines de *Plantago notata*, sont à 4M TFA et à 100°C pendant 30mn. Il est noté 6 oses simples avec une production de 1,18ug/ml de composés furfuraliques. Les polysaccharides hydrosolubles, semblent être constitués de galactose, de glucose, d'acide glucuronique, de xylose, et une faible quantité de l'arabinose.

Les conditions optimales d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles des graines d'*Astragalus armatus* à 4M TFA et à 100°C permet l'obtention de 5 oses simples pendant en 30mn avec 1.63ug/ml de composés furfuraliques. Les oses simples constitutifs sont l'arabinose, le galactose, l'acide glucuronique et le mannose.

Pour les bulbes d'*Urginea noctiflora*, les conditions à 2M TFA et à 100°C, donnent 05 oses simples en 2 heures avec 1.24ug/ml de composés furfuraliques. Les polysaccharides des bulbes d'*Urginea noctiflora*, renferment de l'arabinose, du galactose, du glucose, de l'acide glucuronique et du fructose.

#### **II.4.1.2.- Analyse des résidus glycosidiques**

Après la libération des oses par hydrolyse acide, les résidus glycosidiques sont analysés par chromatographie échangeuse d'anions haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC- PAD) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ionisation électronique (GC/MS-EI).

#### II.4.1.2.1.- Analyse des résidus glycosidiques d'*Astragalus armatus*

La détermination de la composition en oses constitutifs des polysaccharides des graines d'*Astragalus armatus*, est réalisée par GC-MS après triméthylsilylation, puis confirmée par HPAEC- PAD (tableau 14). Il suggère la présence de galactomannane. La composition en oses démontre clairement la présence majoritaire de galactomannane avec 59,9% de D-mannose et 40,1% de D-galactose avec un ratio man/gal de 1,6 d'après les résultats GC/MS-EI et de 1,5 avec les résultats HPAEC (fig. 20).

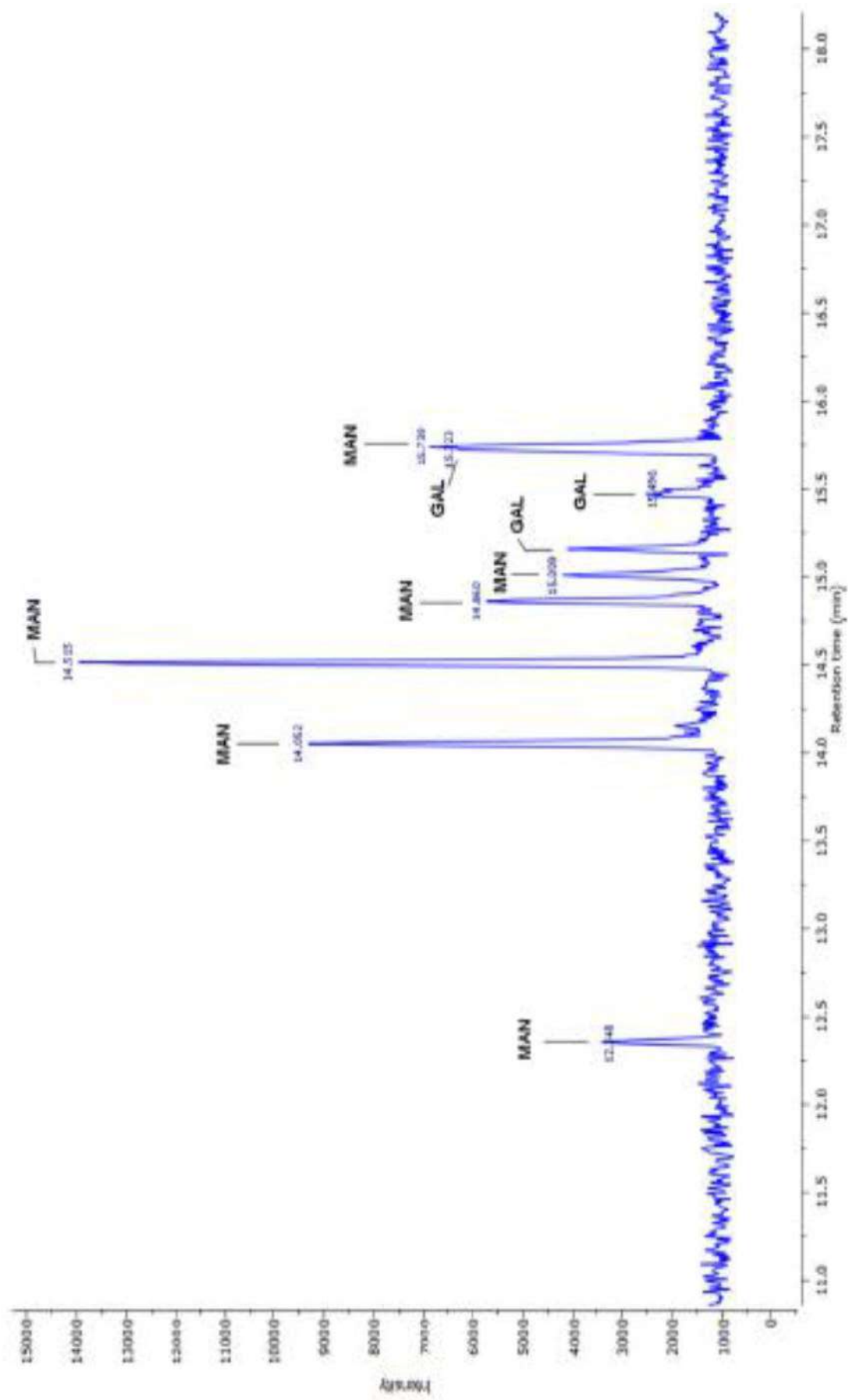
**Tableau 14.-** Quantification des monosaccharides composés des polysaccharides d'*Astragalus armatus* par HPAEC-PAD et GC/MS-EI

Monosaccharides	HPAEC-PAD	GC/MS-EI
	Pourcentage (oses%)v/v	Pourcentage (oses%) v/v
D-mannopyranose	59,9	62,5
D-galactopyranose	40,1	37,5

Ce résultat s'avère conforme avec les galactomannanes hydrosolubles retrouvés dans des extraits polysacchariques provenant de graines des Fabaceae. La composition monosaccharidique des polysaccharides des graines d'*Astragalus armatus* ainsi que le rapport entre le galactose et le mannose, sont caractéristiques des galactomannanes des Fabaceae. La similitude de la composition monosaccharidique enregistrée entre les polysaccharides des graines d'*Astragalus armatus* et les polysaccharides des graines des Fabaceae suggère que l'étape d'extraction préserve l'intégrité des structures polysaccharidiques.

Les galactomannanes sont des polysaccharides hydrosolubles et neutres isolés de l'endosperme de graines d'environ 70 espèces de Fabaceae et de la paroi cellulaire de certaines bactéries (DAKIA *et al.*, 2008). Les différentes sources de galactomannanes ont une structure primaire similaire comprend une chaîne principale d'unités de  $\beta$ -D-mannose 1,4 liées avec des ramifications d'unité  $\alpha$ -D-galactose 1,6 liées à la chaîne principale de mannane. Toutefois, le degré de ramification exprimé par le rapport du mannose sur galactose des galactomannanes, est notablement différent. La différence structurale agit fortement sur les interactions moléculaires et les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannanes.





**Figure 20.-** Profil GC/MS-EI des trimethylsilyl-O-glycosides issus des polysaccharides d'*A. armatus*

Le rapport mannose sur galactose (M/G) de la gomme de caroube, est approximativement égal à 4:1, tandis que celui de la gomme de tara est d'environ 3:1, celui de la gomme guar est d'environ 2:1 et celui de la gomme de fenugrec d'environ 1:1 (DAKIA *et al.*, 2008).

LAZARIDOU *et al.* (2000); RIZZO *et al.* (2004) ont montré que les caractéristiques moléculaires des galactomannanes, à savoir le rapport M/G et la masse molaire, se varie selon la variété d'espèce et les conditions de culture, tant que la méthode d'extraction ou de préparation du polymère (DA SILVA *et al.*, 1990; DAKIA *et al.*, 2008). RIZZO *et al.* (2004) ont mis en évidence une différence dans le rapport M/G dans les variétés de caroubiers d'Italie ; la variété Latinissima a un rapport M/G de 4,0 tandis que la variété Tantillo a un rapport M/G de 2,9.

RIZZO *et al.* (2004) ont il est prouvé qu'un rapport du mannose sur galactose relativement faible, qui correspond à une forte teneur en galactose dans la chaîne de galactomannane, montre une solubilité élevée. La mise en solution des galactomannes renferment plus de résidus galactose sont plus facilement solubles à froid. A titre d'exemple, le guar d'un rapport molaire M/G = 2:1 avec 40% de galactose atteint une solubilité et une viscosité maximum à 40 °C. Par contre, les macromolécules faiblement ou non ramifiées sont difficilement solubles et forment parfois d'amas de polymères très difficilement accessibles au solvant. Un chauffage sous agitation forte est donc nécessaire pour atteindre une solubilisation et une viscosité maximum. Comme exemple, la caroube d'un rapport molaire M/G = 4:1 avec 20% de teneur en galactose, atteint une solubilité et une viscosité maximum à 80°C (FENNEMA, 1996; KÖK *et al.*, 1999; DAKIA *et al.*, 2008).

Par ailleurs, BRUMMER *et al.* (2003) montrent que l'augmentation de la teneur en galactose chez les galactomannanes, aboutit à une diminution de la valeur de tension interfaciale. La gomme de fenugrec (M/G = 1,05 à 1,02) abaisse rapidement les valeurs de tension interfaciale en dessous de 25mN.m<sup>-1</sup> pour une concentration d'au moins 0,05%, tandis que la gomme guar (M/G = 2), le fait pour une concentration d'au moins 0,4%. Par contre, la gomme caroube (M/G = 4), reste aux valeurs de ± 30mN.m<sup>-1</sup> suivant les concentrations allant de 0 à 0,6%. Ces observations font penser qu'une structure plus ramifiée (équivalent à une teneur élevée en galactose) des galactomannanes favorise leurs propriétés de surface.

Le galactomannane isolé des graines d'*Astragalus armatus*, est fortement ramifiées avec un rapport M/G bas de 1,6, semble interagi préférentiellement avec l'eau. Ainsi, on prévoit une viscosité faible due au manque de zones non-substituées qui favorisent des interactions intra et inter chaines. L'augmentation du nombre d'unités galactose, évolue avec la diminution des interactions dans les galactomannanes. Le galactomannane d'*Astragalus armatus* peut être utilisé comme agent émulsifiant, abaisse la tension de surface et stabilise les émulsions en formant un film liquide autour des gouttelettes.

#### II.4.1.2.2.- Analyse des résidus glycosidiques de *Plantago notata*

L'étude de la composition osidique des polysaccharides hydrosolubles issus des graines de *Plantago notata* par HPAEC-PAD, après hydrolyse acide et par GC-MS/EI après hydrolyse acide et triméthylsilylation, permet de préciser les oses constitutifs (fig. 21). Elle révèle que les polysaccharides, sont constitués principalement de D-xylofuranose, acide D-galacturonique, D-glucofuranose, D-galactopyranose, L-rhamnopyranose, et L-arabinofuranose dans les proportions 38,1%, 18,0%, 12,5%, 10,6%, 10,8%, et 9,90%, respectivement. Il est remarqué que la prédominance de xylose et la présence de l'arabinose, semble être due aux polysaccharides de type xylane ou arabinoxylane. Le rapport arabinose / xylose est de 0,26. Ainsi, la quantité appréciable d'acide galacturonique et la présence de rhamnose, laissent penser qu'on est également en présence d'une pectine (tableau 15).

**Tableau 15.-** Quantification des monosaccharides composés des polysaccharides de *Plantago notata* par HPAEC-PAD et GC/MS-EI

Monosaccharides	HPAEC-PAD	GC/MS-EI
	Pourcentage (oses%) v/v	Pourcentage (oses%) v/v
L-arabinose	9,90	7,60
D-galactopyranose	10,6	12,1
D-glucofuranose	12,5	12,1
D-galacturonic acid	18,0	18,3
D-glucuronic acid	trace	Trace
L-rhamnopyranose	10,8	8,10
D-xylofuranose	38,1	41,8

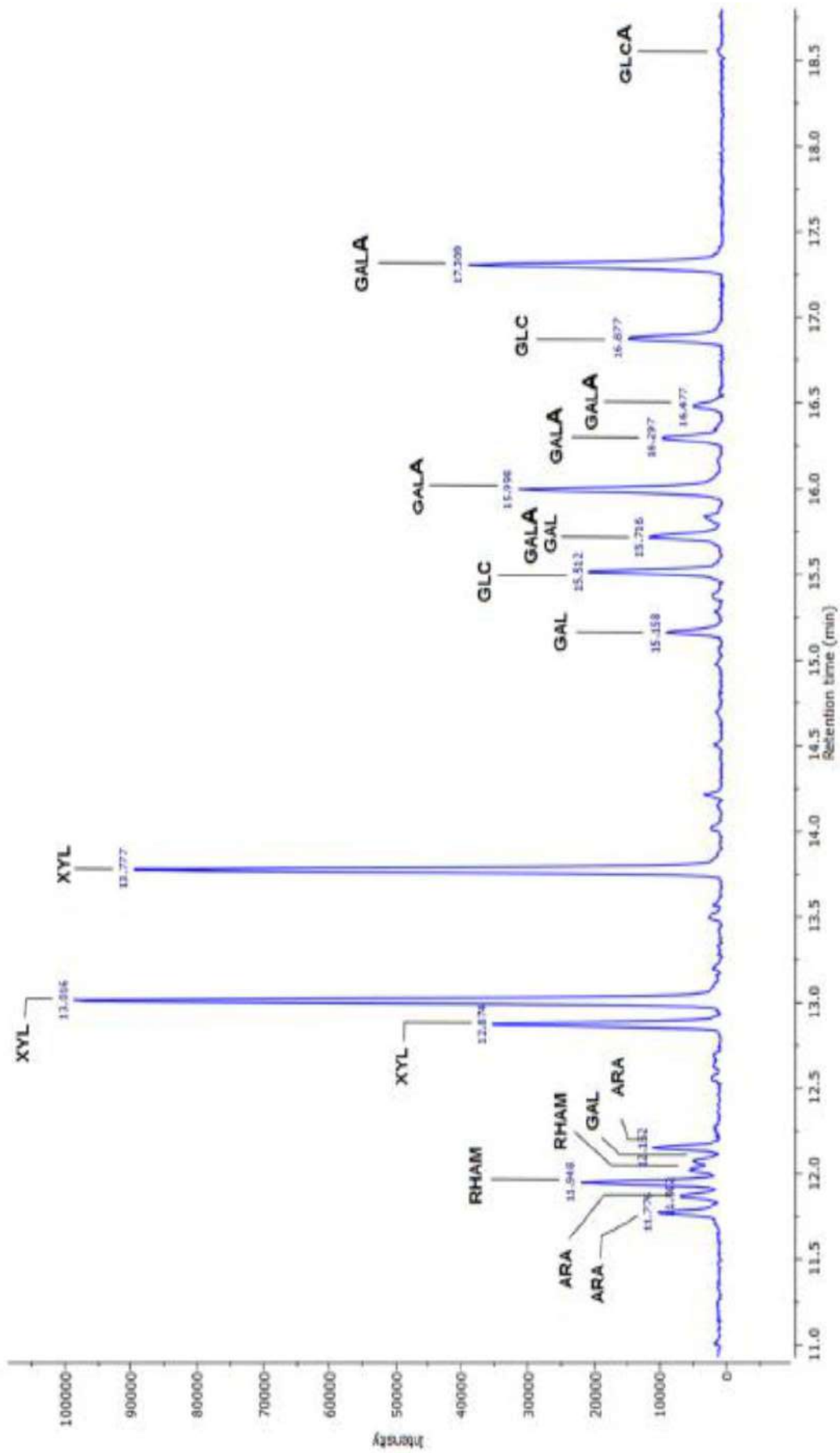


Figure 21.- Profil GC/MS-EI des triméthylsilyl-O-glycosides issus des polysaccharides de *Plantago notata*

Les arabinoxyanes représentent le type de xylane le plus étudié à ce jour (WARRANT, 2004). Ils peuvent être extraits de différentes sources. Les arabinoxyanes sont présents dans de nombreux tissus des principales céréales commercialisées. Ils constituent une part importante des parois cellulaires des végétaux. Un grand nombre ne peut pas être extrait des parois cellulaires à l'eau. Cette différence de solubilité, est liée au type de substitution ou à la présence de liaisons covalentes (ester) entre des acides uroniques et les groupements hydroxyles des arabinoxyanes. Les xylanes déacétylés, sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans des solutions alcalines et sont facilement hydrolysés en présence d'acides. Les xylanes acétylés peuvent être extraits par de l'eau chaude et sont plus solubles dans l'eau. Les arabinoxyanes se distinguent essentiellement par leur masse moléculaire et leur degré de substitution par l'arabinose exprimé par leur rapport arabinose/xylose (A/X). Donc, il semble que l'arabinxylane extrait des graines de *Plantago notata*, est acétylé.

TOMODA et UNO (1971) signalent que le mucilage des graines de *Plantago asiatica* est constitué de polysaccharide acide composé de D-xylose, L-arabinose, L-rhamnose, D-galactose et acide D-galacturonique dans un rapport molaire 15/3/2/0,4/4. Le rapport arabinose/xylose est de 0,2. Donc, il peut se remarquer une similitude dans la composition structurale avec celle *plantago notata*, et les rapports arabinose/xylose semblent plus proche.

L'analyse de la composition des polysaccharides des graines de *Plantago asiatica* par CPG, a montré qu'ils se caractérisent par des teneurs élevées en xylose ( $44,39 \pm 0,05$ ), en arabinose ( $17,28 \pm 0,09\%$ ), et en acide glucuronique ( $22,05 \pm 0,06\%$ ), avec une faible teneur en galactose ( $2,27 \pm 0,10$ ), en rhamnose ( $1,67 \pm 0,10$ ), en glucose ( $0,14 \pm 0,05$ ) et en mannose ( $0,08 \pm 0,01$ ) (HU *et al.*, 2013c).

YAMADA *et al.*, (1986) ont extrait un mucilage à partir des graines de *Plantago asiatica*. Le mucilage se constitue d'un polysaccharide acide partiellement O-acétylé, (1→4) -β-D-xylopyranane avec des ramifications composées de O-(acide α-D-glucuropyranosyl)-(1→3)-α-L-arabinofuranose et O-(acide α-D-galacturopyranosyl)-(1→3)-α-L-arabinofuranose en position 3 de la chaîne principale xylopyranane. Une activité anti-complément considérable, est remarquée chez ce polysaccharide.

YIN *et al.* (2012) ont séparé trois fractions polysaccharidiques des graines de *Plantago asiatica*, PLP-1 (18,9%), PLP-2 (52,6%) et PLP-3 (28,5%) par

chromatographie d'exclusion stérique sur Sephacryl S-400. L'étude structurale montre que la fraction majeure PLP-2, est composée de rhamnose, d'arabinose, de xylose, de mannose, de glucose et de galactose, dans un rapport molaire de 0,05:1,00:1,90:0,05:0,06:0,10. Son acide uronique est l'acide glucuronique. Il se remarque une similitude dans la composition structurale avec celle de *Plantago notata*. Cependant, il est noté une différence dans le type d'acide et les pourcentages d'oses dans la molécule de polysaccharide. Le PLP-2 est un hétéroxylane hautement ramifié composé d'un squelette xylopyranose  $\beta$ -1,4 lié et des chaînes latérales attachées en O<sub>2</sub> ou en O<sub>3</sub>. Les chaînes latérales sont constituées de xylopyranose, d'arabinofuranose, d'acide glucuronique, des chaînes de  $\beta$ -xylopyranose-(1→3)- $\alpha$ -arabinofuranose et d' $\alpha$ -arabinofuranose-(1→3)- $\beta$ -xylopyranose. Le rapport arabinose/xylose, est de 0,52.

SANDHU *et al.* (1981) ont caractérisé une fraction de polysaccharide de *Plantago ovata*, qui se compose d'une chaîne linéaire de D-xylopyranose  $\beta$ -(1→4) lié. Ce xylane est substitué en position 2 et/ou en position 3 par  $\alpha$ -D-galactopyranose (1→2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranose,  $\alpha$ -L-arabinofuranose et  $\beta$ -D-xylopyranose.

Le mucilage de *Plantago ovata* renferme des polysaccharides similaires, mais de masses molaires différentes. Il s'agit d'hétéroxylanes qui consistent en un squelette de  $\beta$ -D-xylopyranose liés en (1→3) et (1→4) avec des chaînes latérales courtes liées en O-2 sur certains des résidus xylose ou en O-3 sur d'autres (WARRANT, 2004).

CRAEYVELD *et al.*, (2009) ont extrait de téguments des graines de psyllium (*Plantago ovata* Forsk) un polysaccharide majoritaire, appelé polysaccharides Seed Husk (PSH). C'est un hétéroxylane complexe. Ces principaux monosaccharides, sont l'arabinose et le xylose. C'est pourquoi, il est en outre appelé arabinoxylane. Le PSH est un polysaccharide hautement ramifié avec une chaîne principale de  $\beta$ - (1→4) xylopyranose substituée aux positions 2 et/ou 3 par des résidus d'arabinofuranose et de xylopyranose simples, ou par des chaînes latérales courtes composées de ces monosaccharides. Le PSH contient des résidus supplémentaires, tels que le rhamnose (5,3%) et de l'acide galacturonique (5-8%).

Ainsi, un hétéroxylane acide isolé des graines de *Plantago major*, possède une activité anti-complément, mais présente une structure différente de celle de *Plantago asiatica*. Il est constitué d'une chaîne principale de  $\beta$ -D-xylopyranose (1→3) et (1→4), liée avec des chaînes latérales courtes attachées en O-2 de certains résidus  $\beta$ -D-

Xylopyranose et en O-3 d'autres résidus de  $\beta$ -D-Xylopyranose. Les chaînes latérales sont constituées de résidus  $\beta$ -D-Xylopyranose et  $\alpha$ -L-Arabinofuranose,  $\alpha$ -L-Arabinofuranose (1 $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-Xylopyranose et d'acide  $\alpha$ -D-Glucuropyranosyl (1 $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -L-Arabinofuranose (SAMUELSEN *et al.*, 1999).

PMII, polysaccharide de type pectique biologiquement actif, est isolé à partir des feuilles de *Plantago major*. Cette espèce végétale, est utilisée en médecine traditionnelle pour la cicatrisation des plaies. PMII est constitué de 71,7% d'acide galacturonique, 4,2% de rhamnose, 8,8% d'arabinose et 8% de galactose. Il possède une activité anti-complément et induit la production de facteur alpha de nécrose tumorale (TNF-CY) à partir de monocytes humains (SAMUELSEN *et al.*, 1996).

#### II.4.1.2.3.- Analyse des résidus glycosidiques d'*Urginea noctiflora*

L'analyse de la composition monosaccharidique des polysaccharides hydrosolubles issus des bulbes d'*Urginea noctiflora* par HPAEC-PAD et par CG-MS/EI, révèle la présence de glucose, de mannose, et de galactose dans les proportions 54.3%, 30,9%, et 14,9%, respectivement (fig. 22). Ainsi, il est remarqué la présence de L-arabinose et d'acide D-glucuronique sous forme de traces (tableau 16). La bonne corrélation des données recueillies par le dosage colorimétrique et celle des techniques analytiques, est un indice qui assure par ailleurs de la bonne transposition de la méthodologie à l'échelle analytique. Compte tenu de la nature de la matière première, des teneurs élevées de l'ordre de 50,2% de glucose peuvent être expliquées, soit par la présence d'un glucane ou par la contamination de l'extrait brut par de l'amidon co-précipité au cours de l'extraction. La composition ressemble à certains types de glucomannane. Dans ce cas, on est peut-être en présence de deux familles de polysaccharides; un glucane et un galacto-glucomannane.

KURT et KAHYAOGU (2014), rapportent que les monocotylédones présentent des réserves de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glucomannanes dans les tissus végétatifs, en particulier dans les racines, les tubercules et les bulbes des Liliaceae, des Amaryllidaceae, des Orchidaceae et des Araceae. Les glucomannanes sont constitués d'une chaîne linéaire de mannoses et de glucoses, liées en  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) partiellement acétylées, avec une substitution de galactose en position C-6 des mannoses. Le rapport des unités mannose et glucose dans le polysaccharide, est d'environ 3:1, et la distribution des deux monomères est généralement aléatoire.

**Tableau 16.-** Quantification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides d'*Urginea noctiflora* par HPAEC-PAD et GC/MS-EI

Monosaccharides	HPAEC-PAD	GC/MS-EI
	Pourcentage (% oses) v/v	Pourcentage (% oses) v/v
L-arabinose	trace	Trace
D-galactopyranose	11,2	14,9
D-glucopyranose	50,2	54,3
D-glucuronic acid	trace	Trace
D-mannopyranose	38,6	30,9

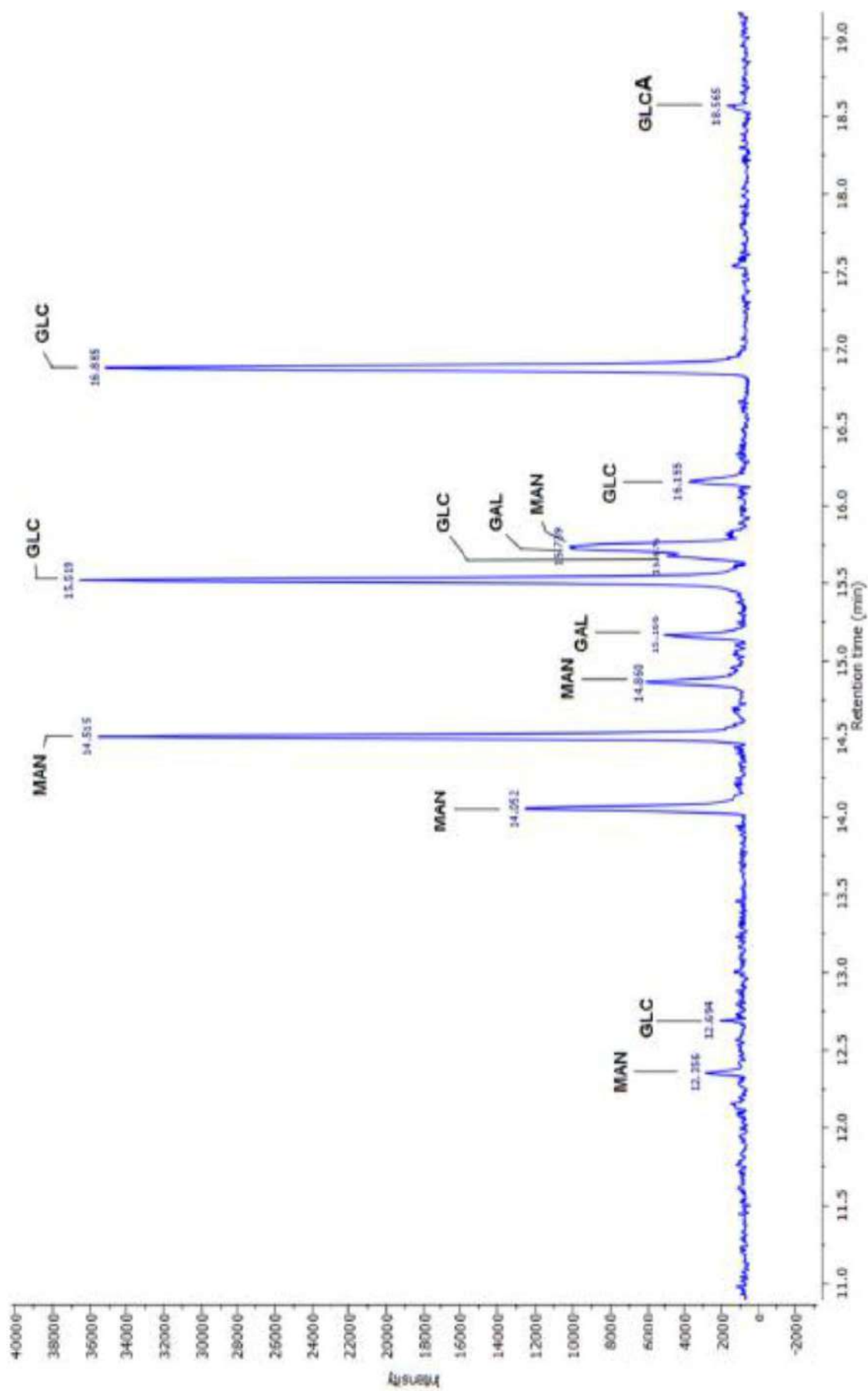
Ces glucomannanes, sont utilisés comme des fibres alimentaires dans le traitement du diabète ou contre l'obésité et l'hypertension. L'état de constipation chronique ou l'hypercholestérolémie, est également affectée positivement par les glucomannanes (WOZNIEWSKI *et al.*, 1991).

SINGH et MALVIYA (2006), ont extrait à partir des graines de *Bryonia lacinosa* par l'acide acétique à 1% un polysaccharide, comportant de D-glucose et du D-mannose dans un rapport molaire de 1,00:1,01.

LI *et al.* (2014), ont montré que le glucomannane de konjac, extrait des tubercules d'*Amorphophallus konjac*, est un polysaccharide hydrosoluble, composé de D-mannose et de D-glucose  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), lié dans un rapport molaire de 1,6:1 ou de 1,4:1. En fait, le ratio diffère avec les variétés de konjac. Il renferme des groupes acétyles attachées de façon aléatoire à la position C<sub>6</sub> du mannose le long de la molécule, d'environ 1 pour 19 résidus monosaccharidiques. Ainsi, il contient des chaînes latérales qui relient à la chaîne principale au C<sub>3</sub> du mannose. Il est considéré comme une sorte de fibres alimentaires, qui a des fonctions importantes en matière de santé et largement utilisée dans l'industrie alimentaire en raison de ces propriétés épaississantes et gélifiantes (ZHANG *et al.*, 2014).

Les polysaccharides extraits de mésophylle des feuilles d'*Aloe vera* (Liliaceae), se composent principalement de glucomannanes. Ils sont associés à différents effets cliniques telles que la cicatrisation, l'anti-inflammatoire et à l'activité immunomodulatrice.





**Figure 22.-** Profil GC/MS-EI des triméthylsilyl-O-glycosides issus des polysaccharides d'*Urginea noctiflora*

GRACE *et al.* (2013) signalent que le glucomannane, le galactane et le galacturonane sont les polysaccharides les plus fréquemment rapportés chez les espèces du genre *Aloe* étudiées à ce jour. Ce résultat s'avère conforme avec les polysaccharides hydrosolubles retrouvés dans les extraits aqueux provenant de bulbes d'*Urginea noctiflora*.

L'étude de GRACE *et al.* (2013) sur 31 espèces du genre *Aloe*, montre que le glucose est le principal constituant dans la majorité des échantillons (19 espèces), le mannose est le constituant principal dans huit espèces, alors que le xylose ne l'est que dans une seule espèce. Tandis que, une seule espèce dont le galactose est le monosaccharide prédominant. Les glucomannanes d'*Aloe* spp, font exception aux autres espèces de la famille des Liliaceae par la présence de xylose.

JAKIMOW-BARRAS (1973) rapportent que les graines de 7 espèces de Liliaceae, semblent toutes contenir des polysaccharides de type galactoglucomannane et/ou glucomannane. Dans aucun cas, la présence d'amidon n'a pu être décelée dans les cellules de l'endosperme.

L'étude structurale d'un polysaccharide de réserve hydrosoluble contenu dans l'endosperme de l'*Asparagus officinalis*, indique qu'il s'agit d'un galactoglucomannane, dont les oses constitutifs se trouvent dans un rapport de Glc/Man/Gal = 43/49/7. Le rapport des unités de mannose et de glucose dans le polysaccharide, est d'environ 1,19:1,00. Ce polysaccharide est formé d'une chaîne linéaire composée d'unités D-glucosyl et D-mannosyl possédant, des liaisons de type  $\beta(1\rightarrow4)$ . A ces unités viennent s'ajouter latéralement des unités de D-galactose, dont le type de liaison, est de  $(1\rightarrow6)$ .

CHEN *et al.* (2014) ont purifié trois fractions polysaccharidiques de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de bulbes de *Lilium lancifolium* (Liliaceae). Il s'agit de LLPS-1, LLPS-2, et LLPS-3. Le LLPS-1 et LLPS-2, sont constitués principalement de glucose et de mannose dans un rapport molaire de 1:2 et de 1:1, respectivement. Le LLPS-3, renferme de l'arabinose, du galactose, du glucose et du mannose dans un rapport molaire presque de 2:2:2:1. Les fractions de LLPS, ont stimulé la prolifération des macrophages murins (RAW 264.7). Le traitement des macrophages avec 25 à 400mg/ml de LLPS pourrait augmenter l'activité phagocytaire et la production d'oxyde nitrique des macrophages d'une façon dépendante de la dose.

Dans les bulbes d'*Urginea noctiflora*, se retrouvent des polysaccharides constitués principalement de glucose et de mannose. Le galactose est présent aussi mais en faible quantité. La structure de ce polysaccharide, est conforme à celle observée dans le cas d'espèces comme *Amorphophallus konjac*, *Aloe* spp, *Asparagus officinalis*, *Lilium lancifolium* qui sont très voisines. *Urginea noctiflora* possède un autre point commun avec *Asparagus officinalis* et *Endymion nutans*. Leurs glucomannanes contiennent autant de glucose que de mannose (GOLDBER, 1969). Cependant, *Amorphophallus konjac*, *Aloe* spp, *Lilium lancifolium*, possèdent des glucomannanes dont le rapport mannose/glucose, varie de 1,60 jusqu'à 3.

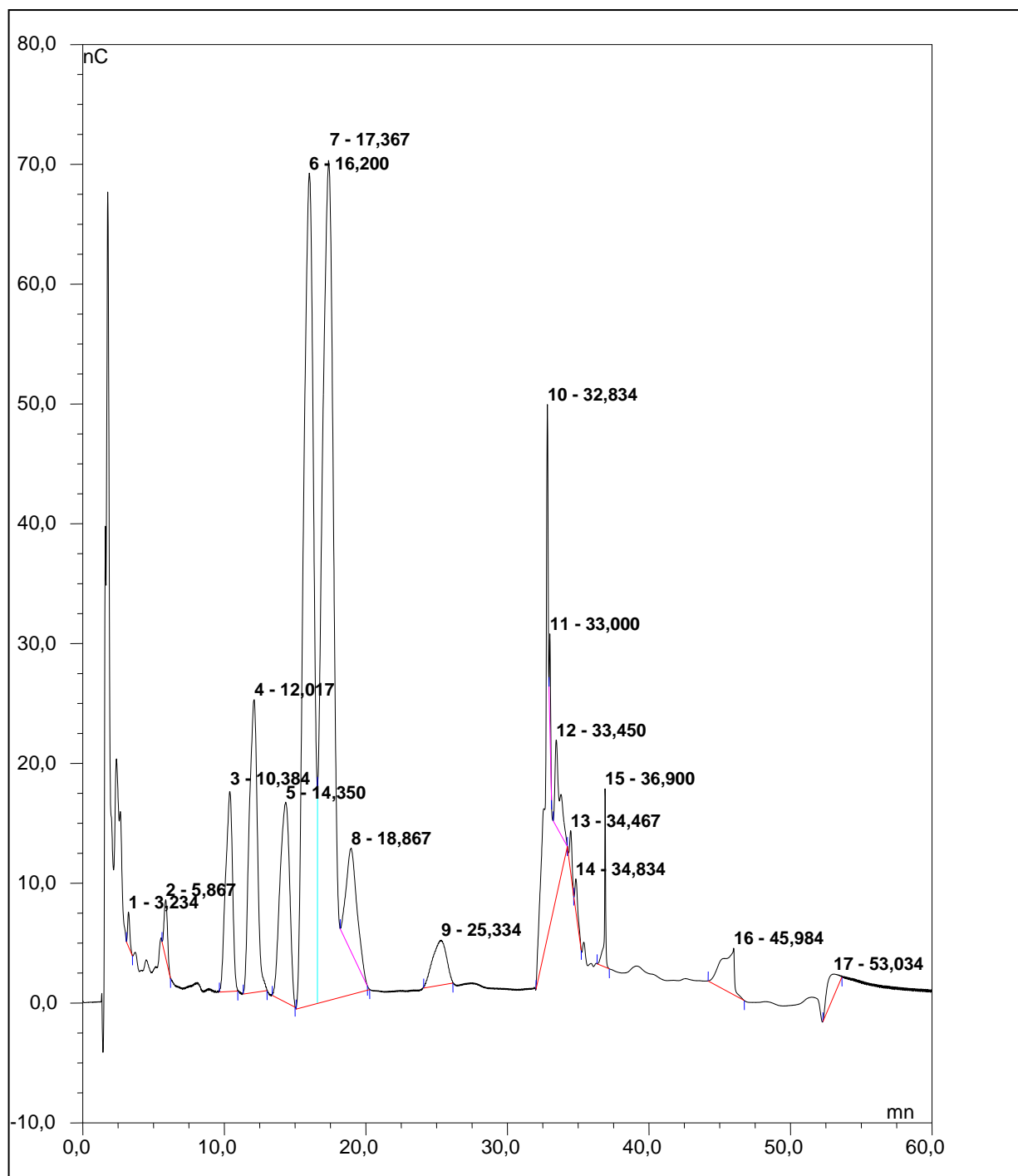
#### II.4.1.2.4.- Analyse des résidus glycosidiques d'*Asphodelus tenuifolius*

La figure 23 illustre le profil HPAEC-PAD de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*. Il apparaît une prédominance de mannose à 33,45% et de glucose à 26,89%, suivie de 9,31% de l'acide glucuronique et 7,59% d'arabinose. Le rhamnose et le xylose, sont présents en faible pourcentage avec 4,45% et 3,53%, respectivement (tableau 17). Le rapport molaire des oses majeurs d'*Asphodelus tenuifolius* pour Glc/Man, est de 1,00/1,24. Des études sur les extraits de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae), effectuées par FEMENIA *et al.* (1999) rapportent des pourcentages de mannose et de glucose, de l'ordre de 75% des oses totaux. De même, la présence de rhamnose, d'arabinose et d'acide uronique, laissent supposer l'existence des pectines. Le faible pourcentage de xylose, semble venir des hémicelluloses (FEMENIA *et al.*, 1999).

L'étude de BUCKERIDGE *et al.* (2000), montre la présence de polymère de type Glucomannane chez plusieurs espèces de la famille des Liliaceae tels que *Asparagus officinalis*, *Edymion mutans* et *Scilla nonscripta*. Le fort pourcentage de glucose et de mannose, montre la présence de polysaccharide de type glucomannane dans l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*.

L'analyse des polysaccharides hydrosolubles, indique que la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* et les feuilles d'*Aloe barbadensis*, sont assez semblables en composition et contiennent principalement des mannanes et des polysaccharides pectiques tandis que le rapport Man/Glc d'*Asphodelus tenuifolius* (1,24), est très faible par rapport à ce d'*Aloe barbadensis* (1,70).

MABUSELA *et al.* (1990) signalent que les glucomannoglycanes, sont les polysaccharides hydrosolubles majeurs des Aloes.



**Figure 23-** Profil HPAEC-PAD de l'hydrolysat de polysaccharides hydrosolubles extrait de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius*

MABUSELA *et al.* (1990) notent dans l'extrait à l'eau chaude des feuilles d'*Aloe barbadensis* principalement des polysaccharides pectiques et une faible quantité de galactane, de glucomannane et d'arabinane.

Selon MATSUHIRO *et al.* (2006), le mucilage extrait de fruits d'*Opuntia ficus indica*, après hydrolyse acide totale et analyse par CPG des acétates alditol, donnent de l'arabinose, du rhamnose, du xylose et du galactose dans un rapport molaire de 1.0:1.7:2.5:4.1. L'analyse par HPLC de la fraction acide, révèle de l'acide galacturonique. Le mucilage des fruits d'*Opuntia ficus indica*, est un mélange complexe de polysaccharides, dont moins de 50% correspondant aux polysaccharides pectiques.

**Tableau 17.-** Quantification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides d'*Asphodelus tenuifolius* par HPAEC-PAD

Monosaccharides	Pourcentage d'oses (%)v/v
L-arabinose	7,59
L-rhamnopyranose	4,45
D-xylofuranose	3,53
D-glucopyranose	26,89
D-glucuronic acid	9,31
D-mannopyranose	33,45

## II.5.- Activités biologiques des extraits de polysaccharides hydrosolubles

L'activité biologique des polysaccharides, est évaluée par l'étude *in vitro* de leur activité anti-complément. Elle recherche leur pouvoir immuno-modulateur vis-à-vis du système complément, en déterminant leur capacité à inhiber l'activation de ce système présentée par la réduction du degré de la lyse des hématies (CH<sub>50</sub>). Il est déterminé la plus faible concentration capable d'inhiber 50% de l'hémolyse (CI<sub>50</sub>). De même, les effets prébiotiques des différents hydrolysats de polysaccharides, sont testés.

### II.5.1.- Etude de l'activité anti-complément

L'activité anti-complément, fait référence à l'inhibition de l'hémolyse observée en raison de l'interaction entre les protéines du complément et le polysaccharide. Le test ne

fait pas de distinction entre l'activation et l'inhibition du système du complément, mais il montre que le système du complément, est affecté par la présence de certains polysaccharides. Elle est utilisée en essai préliminaire pour la recherche de polysaccharides biologiquement actifs (SAMUELSEN *et al.*, 1998).

#### II.5.1.1.- Détermination de CH<sub>50</sub>

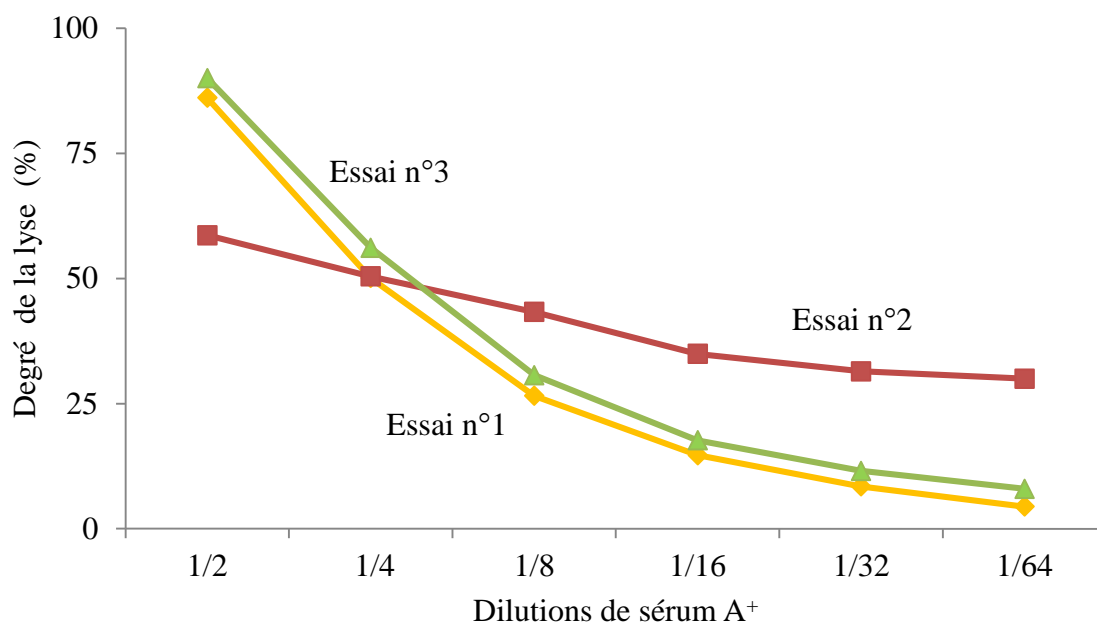
Les figures 24 et 25 illustrent les degrés de la lyse des hématies humaines sensibilisées, par le complément de sérum humain normal dilué dans le tampon véronal de gélatine. Le sérum et les hématies sont de même origine, pour éviter toute réponse immunitaire envisageable.

Les moyennes des dilutions du sérum humain normal amené à 50% de la lyse des hématies sensibilisées des groupes sanguins A<sup>+</sup> et B<sup>+</sup>, sont de 1/4. Il est possible de déduire qu'il n'y a aucune relation entre les types de groupe sanguin (A et B) et l'activité de complément, ce qui n'empêche pas de contrôler à chaque test l'activité de complément à utiliser.

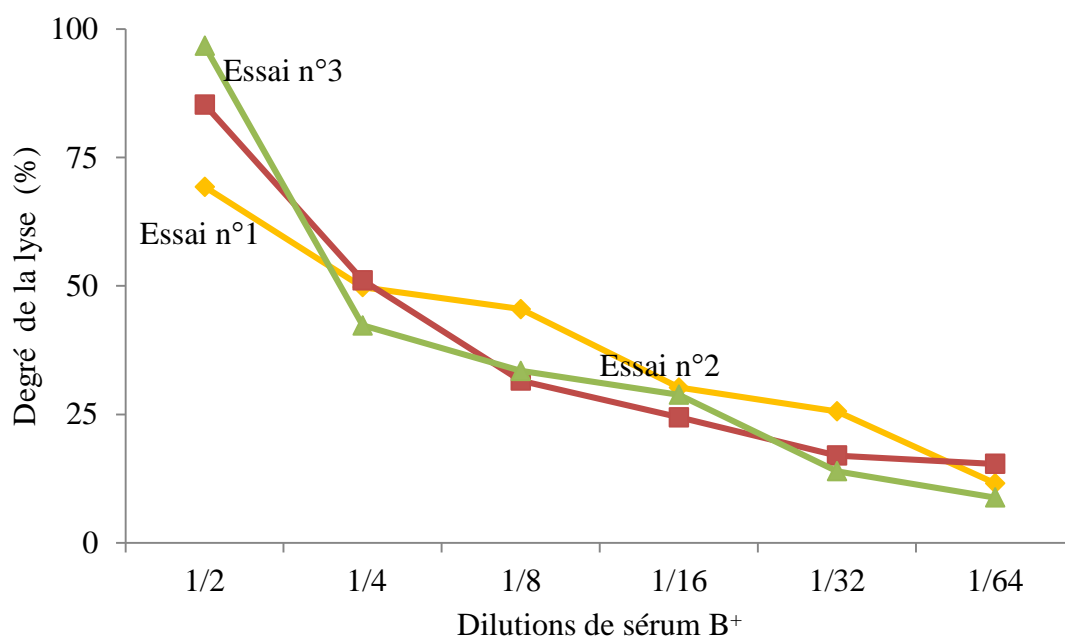
Les efficacités de lyse des hématies sensibilisées des groupes sanguins A<sup>+</sup> et B<sup>+</sup> pendant de courtes durées d'incubation, sont semblable d'où les taux d'activation du complément, sont très proches avec les anticorps Anti-A et Anti-B sur la membrane des cellules A<sup>+</sup> et B<sup>+</sup>. La liaison de Clq à une cible d'anticorps sensibilisés active une cascade, dont les composants peuvent migrer loin de l'anticorps sensibilisant.

DAVIES *et al.* (1989) signalent que la sensibilisation des hématies humains de groupe A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup> et O<sup>+</sup> par des anticorps anti A<sup>+</sup>, anti B<sup>+</sup> et anti O<sup>+</sup> respectivement, forment des complexes immuns et activent le système du complément. L'incubation de ces complexes par le sérum humain normal montre une concentration hémolytique moyenne CH<sub>50</sub> de 1/4 dans les deux groupes sanguins A<sup>+</sup> et B<sup>+</sup>.

Les anticorps de lapin anti- globules rouges de mouton, montrent que la dilution du sérum humain donnant 50% de la lyse, est de 1/10 (XI *et al.*, 2012 ; XU *et al.*, 2007). Pour SAMUELSEN *et al.* (1999) la dilution de sérum humain, donnant 50% de la lyse, est de 1/40.



**Figure 24.-** Degré de la lyse des hématies A<sup>+</sup>sensibilisées, par le complément de sérum humain A<sup>+</sup>



**Figure 25.-** Degré de la lyse des hématies B<sup>+</sup> sensibilisées par le complément de sérum humain B<sup>+</sup>

### II.5.1.2.- Détermination de la concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>)

La concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) des polysaccharides exigent, un prélèvement de sang frais. Les hématies sont lavées et sensibilisées le même jour. Les hématies

acquièrent de nombreuses anomalies pendant leur conservation, telles que la lyse, la peroxydation de leur membrane cellulaire, l'augmentation de leur adhérence et de leur agrégation et la dysfonction du couplage entre l'hémoglobine intra-érythrocytaire et l'oxyde nitrique (LACROIX et TUCCI, 2011). De même, certains composants du complément, sont très facilement activables *in vitro* (FREMEAUX *et al.*, 2012). Le test de détermination de la concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>), est appliqué seulement sur le groupe sanguin A<sup>+</sup>, c'est question de sa disponibilité.

Le sérum hémolytique A<sup>+</sup> utilisé pour la détermination des CI<sub>50</sub> des polysaccharides montre que la dilution responsable de 50% de la lyse des hématies A<sup>+</sup> (CH<sub>50</sub>), est de 1/4. L'héparine est utilisée comme control positif, est l'un des agents le mieux décrit qui montre une inhibition importante de l'activité du complément. Cependant, à la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition significative de complément, l'héparine peut induire des effets secondaires indésirables. Ils s'associent à sa propriété anticoagulante (XU *et al.*, 2007). L'héparine est un copolymère fortement sulfaté de l'acide uronique et de la glucosamine. La concentration de l'héparine sodique qui aboutit à 50% d'inhibition de complément (CI<sub>50</sub>), est de  $0,376 \pm 0,039$ mg/ml. XU *et al.*, (2007) montrent que la concentration d'inhibition de complément 50% de l'héparine sodique est de 690 à 750µg/ml, donc sa capacité d'inhibition de l'activité du complément, semble plus faible de celle trouvé, soit  $0,376 \pm 0,039$ mg/ml. Toutefois, l'héparine pure indique des capacités d'inhibitions supérieures, soit 16 à 36µg/ml (XI *et al.*, 2012) et 150µg/ml (XIE *et al.*, 2007).

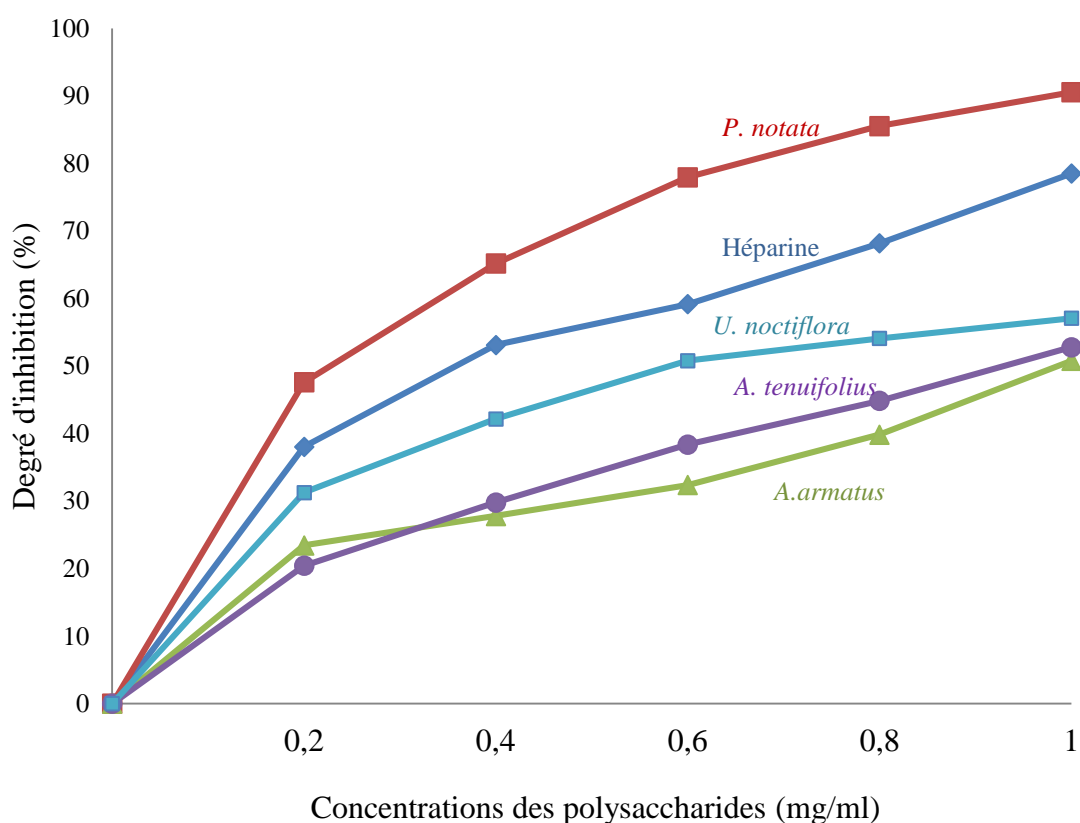
La figure 26 montre que les différents polysaccharides, ont une activité anti-complément dose dépendante. Le degré de la lyse est proportionnel à la concentration en polysaccharides. Toutes les fractions polysaccharidiques testées, montrent une activité de fixation du complément avec des valeurs CI<sub>50</sub> entre  $0,210 \pm 0,028$ mg/ml et  $0,984 \pm 0,21$ mg/ml. Comme le montre la figure 30, les concentrations qui aboutissent à 50% d'inhibition de complément (CI<sub>50</sub>), sont de  $0,210 \pm 0,028$ mg/ml,  $0,590 \pm 0,016$ mg/ml,  $0,947 \pm 0,008$ mg/ml et  $0,984 \pm 0,21$ mg/ml respectivement pour *Plantago notata*, *Urginea noctiflora*, *Asphodelus tenuifolius* et *Astragalus armatus*.

Les polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata*, sont plus efficaces que l'héparine (control positif) dans l'inhibition de l'activité de complément. La fraction polysaccharidique de *Plantago notata* montre une activité d'environ 55% plus élevée que le contrôle positif. A une concentration de 1mg/ml, les polysaccharides hydrosolubles de



*Plantago notata*, a empêché presque la totalité de l'activité hémolytique du sérum humain normal; soit  $93,60 \pm 2,34\%$ , montrant un effet inhibiteur de l'activité du complément par le biais de la voie classique.

Les polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata*, sont les plus actives. De grandes différences sont observées avec les polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* et les autres extraits de polysaccharides. La fraction polysaccharidique de *Plantago notata*, donne une activité 2,8 fois plus élevée que la fraction polysaccharidique d'*Urginea noctiflora* et une activité 4,6 fois plus élevée que la fraction polysaccharidique d'*Astragalus armatus*.



**Figure 26.-** Pourcentage d'inhibition de l'activité de complément

Les polysaccharides de type pectique extrait de feuilles de *Plantago major* L, utilisés comme contrôle positif de l'activité anti-complément, montre une concentration d'inhibition  $CI_{50}$  de  $44 \mu\text{g/ml}$  (HROMADKOVA *et al.*, 2013), alors que DIALLO *et al.* (2001) signalent  $50 \mu\text{g/ml}$ , tandis que SAMUELSEN *et al.* (1999) rapportent une  $CI_{50}$  entre 35 et  $60 \mu\text{g/ml}$ . Ces valeurs de la concentration inhibitrice de 50% de l'hémolyse vont servir généralement comme des indicateurs d'une forte activité anti-complément des pectines qui sont des polysaccharides anioniques. Ainsi, les pectines ayant une activité

anti-complément, ont été isolées à partir de plusieurs plantes telles que les racines de *Glycyrrhiza uralensis* (ZHAO *et al.*, 1991), *Bupleurum falcatum* (YAMADA *et al.*, 1989) et *Angelica acutiloba* Kitagawa (KIYOHARA *et al.*, 1988) qui sont des plantes utilisées comme des anti-inflammatoires dans la médecine traditionnelle chinoise et japonaise.

L'étude de l'activité anti-complément des polysaccharides isolés à partir des feuilles de *Plantago major* L (Plantaginaceae) par SAMUELSEN *et al.* (1998), montre que les fractions polysaccharidique PMIa et PMIb, ont des concentrations d'inhibition de complément  $CI_{50}$  de 200 $\mu$ g/ml et 350 $\mu$ g/ml, respectivement. Ils semblent être des inhibiteurs puissants proches de polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata*. Le polysaccharide PMIa, est un arabinogalactane, constitué de 38% d'arabinose, 49% de galactose, 6% de rhamnose, 7% d'acide galacturonique et 1,5% de protéines. Le polysaccharide PMIb, est un xylan 1,4 lié (SAMUELSEN *et al.*, 1995). Il se remarque une grande similitude structurale avec celles de *Plantago notata*.

L'étude de l'activité anti-complément des polysaccharides isolés des graines de *Plantago major* L, montre que les fractions hétéroxylanes A, B et C obtenues par une chromatographie échangeuse d'ions, présentent des  $CI_{50}$  de 20 $\mu$ g/ml, 120 $\mu$ g/ml et 260 $\mu$ g/ml respectivement. Les sous fractions polysaccharidiques A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub>, obtenues par une chromatographie d'exclusion, ont des  $CI_{50}$  de 30 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml et 300 $\mu$ g/ml respectivement. Cependant, l'extrait brute des polysaccharides des graines de *Plantago major* L, présente à 750 $\mu$ g/ml une inhibition de 90% de l'activité de complément (SAMUELSEN *et al.*, 1999).

L'étude de l'activité anti-complément des polysaccharides isolés de graines de *Plantago asiatica* par YAMADA *et al.* (1986) donnent, la concentration inhibitrice  $CI_{50}$  de complément. Elle est de 350 $\mu$ g/ml. L'étude structurale révèle que les polysaccharides sont composés de xylose, d'arabinose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique.

CHO et LEUNG (2007) ont étudié l'activité hémagglutinante des polysaccharides d'*Astragalus membranaceus*. L'injection dans des rats par voie intra péritonéale de polysaccharides extrait des racines d'*Astragalus membranaceus*, puis les immunisé par des hématies de moutons. Après 14 jours, les sérums de souris sont recueillis et, leur pouvoir agglutinant testé vis-à-vis des hématies de moutons. Il est constaté que les fractions ont des concentrations allant de 50 à 800 $\mu$ g/ml, ne semblent pas avoir une

activité sur l'hémagglutination des hématies de moutons, ce qui indique leur activité anti-complément.

Le fragment à haut poids moléculaire de l'extrait brut des polysaccharides, obtenu de parenchyme des feuilles d'*Aloe vera* (liliaceae), montre une concentration inhibitrice  $CI_{50}$  de 110 $\mu$ g/ml (HART *et al.*, 1988). Ces polysaccharides sont majoritairement constitués de mannose (HART *et al.*, 1988; YAMADA, 1991). Il semble que leur activité anti-complément est plus forte que celles d'*Urginea noctiflora* et d'*Asphodelus tenuifolius* (Lilliaceae), respectivement 0,590 $\pm$ 0,016mg/ml, 0,947 $\pm$ 0,008mg/ml.

Au vu des résultats, *Plantago notata* contient des inhibiteurs du complément puissants. La capacité des polysaccharides de *Plantago notata* à moduler l'activité du complément, pourrait potentiellement être bénéfique dans le traitement de maladies inflammatoires. Une étude plus approfondie devrait être menée pour élucider la relation entre les caractéristiques structurales des différentes fractions de polysaccharides et leur bioactivité.

### **II.5.2.- Activité prébiotique des hydrolysats de polysaccharides hydrosolubles**

Des fermentations de différents hydrolysats de polysaccharides hydrosolubles, sont réalisées en présence d'une souche *Lactobacillus casei* dans le but d'identifier les glucides améliorant la croissance de Lactobacille.

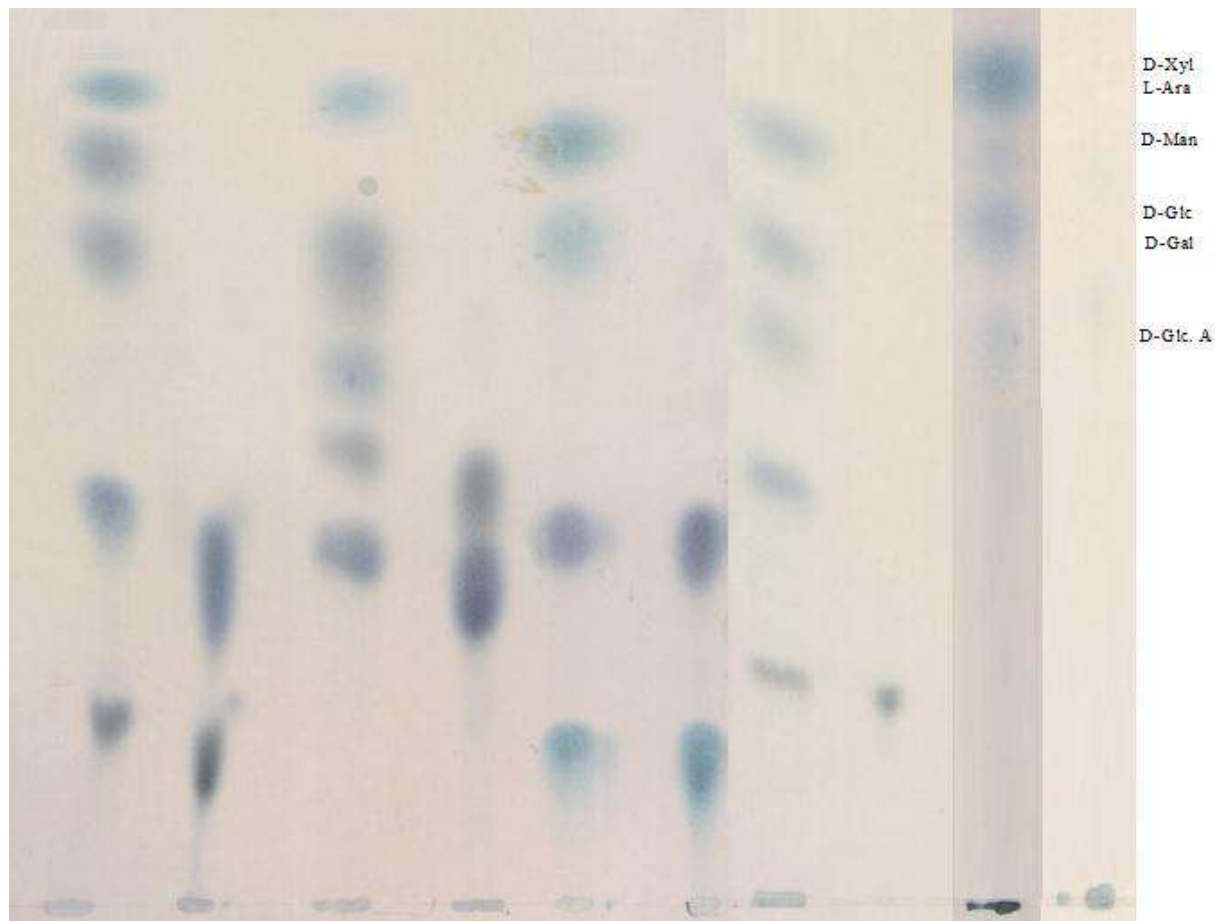
Pour évaluer l'effet prébiotique, quatre types d'hydrolysats, sont choisis. Le choix se base sur le nombre apparu de tâches sur CCM et, qui semblent être des fragments d'oligosaccharides. Les conditions d'hydrolyse des glucides, sont décrites sur le tableau 9.

#### **II.5.2.1.- Elimination sélective des monosaccharides par fermentation**

Les quatre types d'hydrolysats, sont analysés dans un premier temps par CCM, afin de vérifier la présence de fragments oligosaccharidiques et de les comparer à celles des hydrolysats après fermentation par *Saccharomyces cerevisiae*.

L'analyse du chromatogramme (fig. 27), laisse apparaître que le mélange des oses étalons, est presque totalement métabolisé. Seules des traces de xylose et d'acide glucuronique resté non consommé. Pour l'hydrolysats des polysaccharides d'*Asphodelus*

*tenuifolius*, est remarqué 5 taches. Trois correspondent aux monosaccharides L-arabinose ( $R_f = 0,54$ ), D-mannose ( $R_f = 0,41$ ), et D-glucose ( $R_f = 0,36$ ). Les deux premières taches ( $R_f = 0,19$ ;  $R_f = 0,25$ ), semblent être des fragments d'oligosaccharides qui persistent après 32 heures de fermentation. L'hydrolysats des polysaccharides de *Plantago notata*, donne 6 taches avant fermentation.



**Figure 27.-** CCM des hydrolysats des polysaccharides avant et après fermentation par *S. cerevisiae* [de gauche à droite, avant et après fermentation, *A. tenuifolius*, *P. notata*, *A. armatus* ; *U. noctiflora*; mélange des oses, la phase mobile est constituée de Chloroforme- Butanol- Méthanol- Eau-Acide acétique dans les proportions de 4,5- 12,5- 5- 1,5- 1,5]

Après fermentation, il est noté la disparition des taches de  $R_f$ ; 0,55, 0,41, 0,36, 0,35 correspondant aux monosaccharides D-xylose, D-mannose, D-glucose, et D-galactose, respectivement. Des taches de  $R_f$  0,19 et 0,29 qui semblent être des fragments d'oligosaccharides, persistent. La fermentation de l'hydrolysats des polysaccharides d'*Astragalus armatus*, entraîne la disparition totale des taches d'oses simples de  $R_f = 0,41$ ;  $R_f = 0,35$  mais les taches de  $R_f$  0,24 et 0,09, persistent. Pour la fermentation de

l'hydrolysate des polysaccharides d'*Urginea noctiflora*, la disparition des taches de  $R_f$  0,41, 0,36, 0,35, et 0,27 est observée et la persistance de la tache de  $R_f$  0,14, qui semble la seule fraction oligosaccharidique obtenue après fermentation.

L'analyse du chromatogramme, figure 27, permet de constater que les oligosaccharides de masses élevées, obtenus après hydrolyse des polysaccharides par le TFA, possèdent des  $R_f$  faibles. Cela semble être dû à leur masse moléculaire élevée par rapport à celles des oses simples. La résolution entre les fractions oligosaccharides et monosaccharides, est acceptable (fig.27).

La fermentation des oses simples par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est adaptée à l'élimination sélective des monosaccharides. Ses performances natives restent limitées, vu les traînées remarquables des taches qui semblent correspondre aux oligosaccharides.

#### **II.5.2.2.- Effets des hydrolysats de polysaccharides sur *Lactobacillus casei***

L'effet d'hydrolysats de polysaccharides, par addition dans le milieu de culture d'une souche probiotique, est évalué. Il est suivi la croissance du microorganisme et sa capacité à produire des acides gras à courte chaîne. L'estimation se fait par la mesure du pH et de l'acidité titrable du milieu.

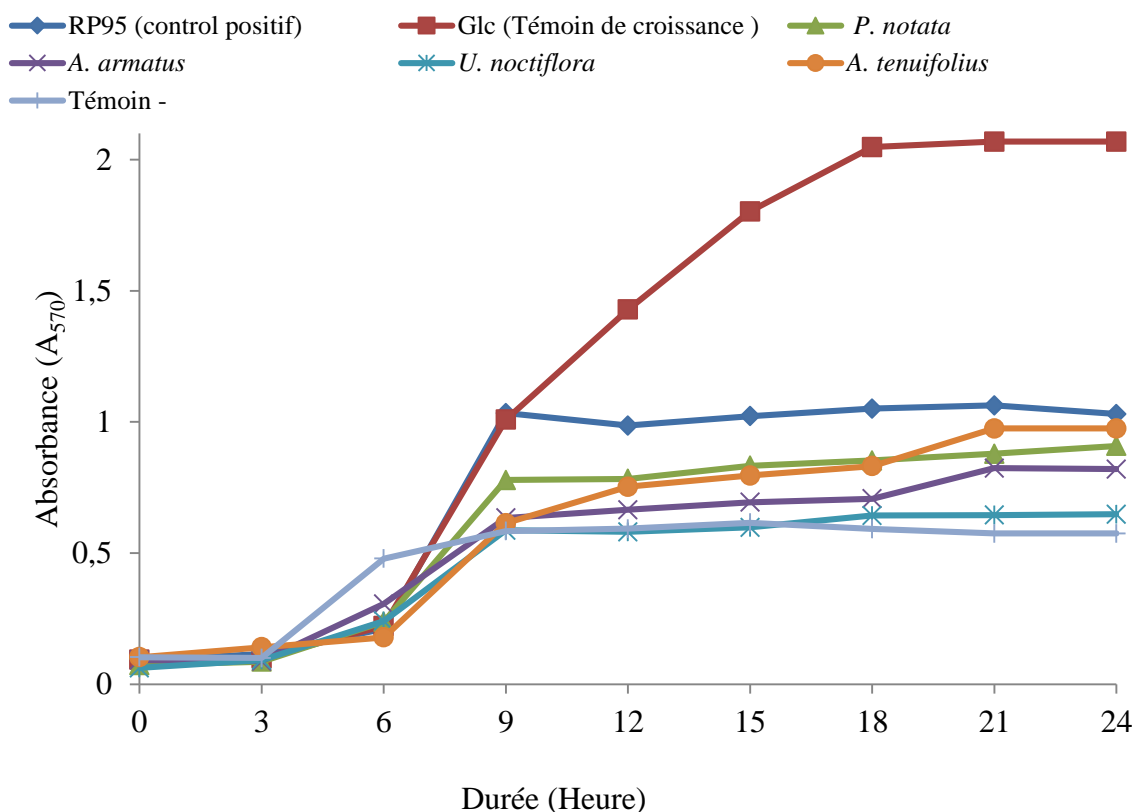
##### **II.5.2.2.1. - Croissance de *Lactobacillus casei***

Les suivis de croissance de *Lactobacillus casei* en présence de chacun des hydrolysats testés comme seule source de carbone glucidique, sont représentés dans la figure 18. Le glucose (témoin de croissance), a montré une croissance accélérée qui atteint 2,069 DO après 18 heures. Par contre, l'absorbance de témoin négatif, est restée faible et ne dépasse pas 0,600 DO.

En présence des fructooligosaccharides (RP 95) (control positif), la souche a atteint un bon niveau de croissance soit 1,022 DO après 15 heures de culture et se stabilise jusqu'à 24 heures. Cette stabilité peut traduire une atteinte de la phase stationnaire plus précoce (GENESTIE, 2006).

La souche a montré des comportements différents en fonction de l'hydrolysate apporté au milieu. Les hydrolysats des polysaccharides hydrosolubles issus de *Plantago*

*notata*, d'*Asphodelus tenuifolius*, d'*Astragalus armatus* et d'*Urginea noctiflora* dans une moindre mesure, engendrent une amélioration de la croissance de *Lactobacillus casei* comparativement au témoin négatif.



**Figure 28.-** Suivi de la croissance de *L. casei* sur MRS complétement par différentes sources carbonées estimée par mesure de DO à 570nm

Bien que l'effet observé soit inférieur à celui produit par le mélange de fructooligosaccharides de référence RP95. La progression de la croissance, observé en présence des hydrolysats de *Plantago notata*, d'*Asphodelus tenuifolius* et d'*Astragalus armatus* est significative et montrant un effet prébiotique des hydrolysats. CRITTENDEN *et al.* (2002) confèrent un effet prébiotique aux oligosaccharides dès lors qu'ils montrent un accroissement de 0,1 DO supérieur à ce du témoin négatif, après 24h de culture. En effet, l'hydrolysate d'*Asphodelus tenuifolius* montre une amélioration de la croissance, estimée par augmentation d'absorbance, après 24h de culture d'environ 0,4 unité à celle mesurée pour le témoin négatif. L'hydrolysate de *Plantago notata* entraîne une amélioration d'environ 0,33 unité à celle mesurée pour le témoin négatif après 24h de culture. Toutefois, l'hydrolysate d'*Astragalus armatus* provoque une progression après 24h de culture d'environ 0,24 unité à celle mesurée pour le témoin négatif. Cet

accroissement de DO n'est pas observé pour l'hydrolysats d'*Urginea noctiflora*, dont il est remarqué une faible amélioration, soit 0,073 unité.

En outre, la croissance de la souche est trois fois supérieure en présence de glucose, mais en aucun cas l'effet des oligosaccharides n'est comparé à ce des oses simples. Le glucose ne peut être considéré comme prébiotique du fait de son absorption précoce au niveau intestinal et par conséquent sa indisponibilité pour stimuler la croissance de la flore endogène au niveau du côlon (SAAD *et al.*, 2013).

#### II.5.2.2.2. - pH et acidité de milieux de culture

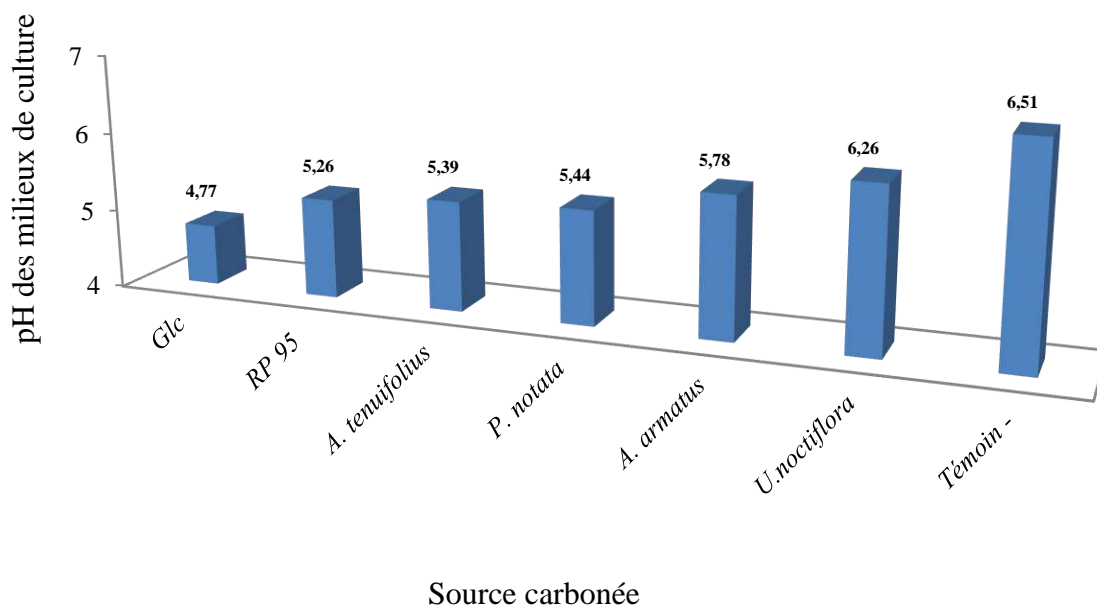
Les résultats de pH final des milieux Man Rogosa Sharpe (MRS) complémenté par différentes sources carbonées mesuré à 27°C, sont présentés dans la figure 29.

Le changement de pH reflète la fermentation des hydrolysats des polysaccharides. Il apparaît que la production d'acide, s'accompagne par une chute de pH. Les valeurs de pH enregistrées après la phase d'incubation, sont de 6,26, 5,78, 5,44, et 5,39 pour les milieux MRS complémentés par les hydrolysats d'*Urginea noctiflora*, d'*Astragalus armatus*, de *Plantago notata*, et d'*Asphodelus tenuifolius*, respectivement (fig. 33). L'augmentation de l'acidité couplée à la diminution du pH, s'explique par activité métabolique de la souche probiotique.

Il est intéressant de noter que les pH des milieux de culture additionnés d'hydrolysats de polysaccharides après fermentation sont inférieurs de celles de contrôle négatif (pH de 6,5).

Elle pourrait être liée à la production à des concentrations plus élevés des acides gras à courte chaine lors de la fermentation des hydrolysats de polysaccharides par *L. casei*. Les valeurs du pH, se situent entre 4,77 et 6,51, selon la source carbonée apportée au milieu MRS.

Cela peut expliquer la variation de l'acidité provoquée par la souche lactique. Une diminution modérée du pH, se remarque dans le milieu de culture à base de glucose (pH 4,77), par rapport à celle de témoin négatif (pH 6,51). La valeur du pH du milieu MRS complémenté par RP95 (control positif), est de 5,26. Elle est inférieure à celles des milieux MRS complémentés par les hydrolysats d'*Asphodelus tenuifolius* et de *Plantago notata*, soit 5,39 et 5,44, respectivement.



**Figure 29.-** Valeurs de pH de milieu MRS complétement par différentes sources carbonées mesurées à 27°C

Une légère diminution du pH, est remarquée dans le milieu MRS complétement par l'hydrolysate d'*Astragalus armatus*, soit 5,78. La plus faible diminution de pH est notée dans le milieu MRS complétement par l'hydrolysate d'*Urginea noctiflora*, soit 6,26. Les valeurs du pH des milieux MRS à base de différents types de fructanes chez la souche *Lactobacillus casei*, sont proches de 5,6. Le pH dépend de la concentration de la source carbonée ajoutée (RENDON-HUERTA *et al.*, 2011).

Une diminution du pH de 6,1 à 5,1 est remarquée dans la fermentation *in vitro* par la flore intestinale du polysaccharide issu des graines de *Plantago asiatica* L., pendant 24 heures. Le polysaccharide est caractérisé par des teneurs élevées en xylose, arabinose et en acide glucuronique. Il se diffère de polysaccharide de *Plantago notata* par le type d'acide uronique et le faible taux de rhamnose ( $1.67 \pm 0.10\%$ ), qui semblent interférer sur la fermentation lactique. Un abaissement du pH de 6,7 à 6,1 est remarqué après fermentation par les bactéries intestinales des polysaccharides de la paroi cellulaire des plantes (VAN LAERE *et al.*, 2000).

Les résultats de l'acidité titrable, sont regroupés dans le tableau 18. Il en ressort du tableau que les milieux MRS complétements par les hydrolysats d'*Asphodelus tenuifolius*, de *Plantago notata*, et d'*Astragalus armatus* ont une acidité appréciable qui s'exprime par la production d'acides gras à courte chaîne au cours de l'incubation pendant 24h. Les



valeurs atteignent 5,76g/l, 5,67g/l et 5,58g/l respectivement.

**Tableau 18.-** Acidité titrable (g/l d'acide lactique) des milieux MRS complémentés par les hydrolysats des polysaccharides

Glucose	RP 95	<i>A. tenuifolius</i>	<i>P. notata</i>	<i>A. armatus</i>	<i>U. noctiflora</i>	Témoin -
7,74	5,85	5,76	5,67	5,58	3,42	1,8

HU *et al.* (2013a) montrent que la présence de l'acide glucuronique et de xylose dans le polysaccharide pourrait induire la production de l'acide acétique au cours de la fermentation intestinale. L'augmentation de la production d'acide propionique est principalement due à la fermentation de xylose et d'arabinose. Ainsi, ils ont montré que l'augmentation de la production de l'acide n-butyrique résulte de la consommation de l'acide glucuronique et de xylose. En effet, il est rapporté des taux d'acidité plus faible de 5,76g/l et 5,67g/l chez l'hydrolysate des polysaccharides d'*Asphodelus tenuifolius* et de *Plantago notata*, respectivement. L'étude structurale antérieure des polysaccharides laisse remarquer la présence de l'acide glucuronique (9,31%) chez *Asphodelus tenuifolius* et la prédominance de xylose (38,1%) chez *Plantago notata*.

Les hydrolysats d'*Astragalus armatus*, de *Plantago notata*, et d'*Asphodelus tenuifolius*, ont un effet stimulateur sur la croissance de *L. casei* à une concentration de 2%. Ces résultats indiquent que les hydrolysats d'*Astragalus armatus*, de *Plantago notata*, et d'*Asphodelus tenuifolius* peuvent être utilisés comme ingrédients prébiotiques dans l'industrie alimentaire, bien que leurs structures ne soient pas encore identifiées.

## *Conclusion et perspectives*

L'étude des polysaccharides hydrosolubles de quelques espèces végétales spontanées à caractère médicinal, utilisées par les populations autochtones de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien), a porté sur quatre plantes réputées dans cette zone saharienne, par leurs effets officinaux. Elle concerne deux espèces de la famille des Liliaceae à savoir *Asphodelus tenuifolius* (Cavan.) et *Urginea noctiflora* (Batt et Trab.), une espèce de la famille des Fabaceae (*Astragalus armatus* Lam.) et une espèce de la famille des Plantaginaceae (*Plantago notata* Lagasca). Les différentes parties des plantes investies sont : la partie aérienne pour *A. tenuifolius*, les bulbes pour *U. noctiflora* et les graines pour *A. armatus* et *P. notata*. La composition chimique des extraits des différents échantillons récoltés a mis en évidence différents groupes chimiques. Il est noté pour les hydrates de carbones des teneurs allant de  $82,58 \pm 0,96\%$  pour les bulbes d'*U. noctiflora*, suivies des graines d'*A. armatus* avec  $76,60 \pm 2,12\%$ , de la partie aérienne d'*A. tenuifolius* ( $74,30 \pm 2,19\%$ ), et les graines de *P. notata* ( $71,77 \pm 3,14\%$ ). Les rendements massiques d'extraits de polysaccharides hydrosolubles par rapport aux matières sèches sont de 2,13% pour la partie aérienne d'*A. tenuifolius*, 4,21% pour les graines d'*A. armatus*, 5,33% pour les bulbes d'*U. noctiflora* et 8,27% pour les graines de *P. notata*.

Toutefois, les extraits des différentes plantes révèlent des teneurs notables en polyphénols dans les extraits polaires d'*U. noctiflora* ( $14,47 \text{ mgGAE/g}$ ) et d'*A. tenuifolius* ( $14,68 \text{ mgGAE/g}$ ) avec des quantités appréciables en flavonoïdes dans les extraits des bulbes d'*U. noctiflora* ( $10,87 \pm 2,30 \text{ mgRE/g}$ ) et la partie aérienne d'*A. tenuifolius* ( $12,23 \pm 1,88 \text{ mgRE/g}$ ).

Les conditions optimales d'hydrolyse acide des polysaccharides hydrosolubles (température, concentration en acide, cinétique de la libération des oses), suivant deux systèmes de séparation par CCM et le dosage des composés furfuraliques, permettent une étude rapide, simple et moins laborieuse d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles des différentes parties des plantes étudiées, pour leur caractérisation. Pour les polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*A. tenuifolius*, il est remarqué que l'hydrolyse à  $80^\circ\text{C}$  et à 2M TFA pendant 1h permet la libération des oses simples, avec un taux plus faible de composés furfuraliques. Les conditions optimales d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles des graines de *P. notata*, sont à 4M TFA et à  $100^\circ\text{C}$  pendant 30mn. Les conditions optimales d'hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles des graines d'*A. armatus* sont à 4M TFA et à  $100^\circ\text{C}$  pendant en 30mn. Pour les bulbes d'*U. noctiflora*, il est retenu 2M TFA et à  $100^\circ\text{C}$ , pendant 2 heures.

L'analyse par GC/MS-EI et HPAEC-PAD de la composition osidique a montré que les graines d'*A. armatus* renferment un galactomannane, fortement ramifiées avec un rapport M/G bas de 1,6, semble interagi préférentiellement avec l'eau. Le galactomannane d'*A. armatus* peut être utilisé comme agent émulsifiant, abaisse la tension de surface et stabilise les émulsions en formant un film liquide autour des gouttelettes. Les graines de *P. notata* semblent renfermer deux types de polysaccharide; un arabinoxylane (rapport A/X de 0,17) et d'une pectine. Les bulbes d'*U. noctiflora*, en contiennent un glucomannane de type galacto-glucomannane. La richesse de l'hydrolysate en glucose laisse à suspecter la présence d'un glucane, qui reste à confirmer ou infirmer après d'autres techniques chromatographiques à savoir la chromatographie d'exclusion stérique. Le fort pourcentage de glucose et de mannose dans l'extrait de polysaccharides hydrosolubles de la partie aérienne d'*A. tenuifolius*, pourrait être un glucomannane.

L'activité anti-complément des polysaccharides hydrosolubles des extraits de graines de *P. notata* et de bulbes d'*U. noctiflora*, a montré une efficacité notable vis à vis l'inhibition de l'activité de complément. Il est remarqué une activité anti-complément appréciable des graines de *P. notata* supérieure à celle de l'héparine. Ces activités anti-compléments vient à appuyer l'utilisation des graines de *P. notata* et les bulbes d'*U. noctiflora* en médecine traditionnelle comme des anti-inflammatoires. Les propriétés anti-compléments des extraits pourraient être un atout supplémentaire dans le traitement de l'anémie hémolytique, inflammatoire et des hémolyses bactériennes.

La mise en œuvre des processus hydrolytiques, laisse remarquer la présence de fractions enrichies en oligosaccharides, mises en valeurs par le test prébiotique. Les fractions oligosaccharidiques, sont purifiées par fermentation à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae*. C'est une élimination sélective des monosaccharides indésirables. L'effet prébiotique des oligosaccharides sur la croissance *in vitro* de *Lactobacillus casei*, a entraîné des améliorations de croissance et une activité métabolique de la souche probiotique plus élevée, estimée par l'augmentation de l'absorbance, après 24h de culture d'environ 0,4 unité pour l'hydrolysate d'*Asphodelus tenuifolius* et 0,33 unité pour l'hydrolysate de *Plantago notata*, par rapport au témoin négatif.

La présente étude montre que certains oligosaccharides peuvent être utilisés comme ingrédients alimentaires fonctionnels stimulant la croissance des souches probiotiques et améliorent leur survie dans le tractus gastro-intestinal.

## **Perspectives**

Il est souhaitable, pour mieux connaître les conditions optimales d'hydrolyse d'utiliser un modèle statistique. De même, il faut faire le suivi du dosage des oses simples libérés lors de l'hydrolyse par la méthode à l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou par HPAEC. La détection des dérivés furfuraliques, doit se faire par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Pour confirmer ou infirmer la richesse de l'hydrolysate des polysaccharides extraits des bulbes d'*U. noctiflora* en glucose qui laisse suspecter la présence d'un glucane, il faut faire appel à la chromatographie d'exclusion stérique, pour leur fractionnement et leur identification.

Pour une meilleure évaluation de l'activité anti-complément des polysaccharides, il est souhaitable de purifier, de fractionner et d'étudier le pouvoir d'inhibition des fractions polysaccharidiques, afin de préciser les parties ayant une capacité d'inhibition de complément appréciable. De même; pour connaître la relation structure fonction, l'analyse structurale par spectrométrie de masse et par la résonance magnétique reste à suivre.

Pour l'effet prébiotique des hydrolysats, une caractérisation chimique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides s'avère nécessaire, et optimiser leur obtention. Rechercher le caractère prébiotique des oligosaccharides sur plusieurs souches probiotiques reconnues et leurs capacités d'adhésion à la mucine gastrique.

## *Références bibliographiques*

- 1.- ABDEL-HAMEED E. S., 2009.- Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples. Food Chemistry, vol. 114:1271–1277.
- 2.- ADESEGUN S. A., ALABI S. O., OLABANJI P.T., et BABATUNDE COKER H. A., 2010.- Evaluation of Antioxidant Potential of *Melanthera scandens*. J Acupunct Meridian Stud, vol. 3 (4):267–271.
- 3.- ALTON G. G., CARTER G. R., KIBOR A. C. et PESTI L., 1992.- Diagnostic bactériologique vétérinaire méthodes de laboratoire pour le diagnostic de certaines maladies de bétail. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Ed. FAO, Rome: 14-18.
- 4.- ATHUKORALA Y., JUNG W. K., VASANTHAN T., et JEON Y. J., 2006.-An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*. Carbohydrate Polymers, vol. 66, :184-191.
- 5.- AUDIGIE C., FIGARELLA J. et ZONSZAIN F., 1984.- Manipulations d'analyse biochimique. Ed. doin, Paris: 3-4.
- 6.- AUSTARHEIM I., MAHAMANE H., SANOGO R., TOGOLA A., KHALEDABADI M., VESTRHEIM A. C., INNGJERDINGEN K. T., MICHAELSEN T. E., DIALLO D. et PAULSEN B. S., 2012.- Anti-ulcer polysaccharides from *Cola cordifolia* bark and leaves. Journal of Ethnopharmacology, vol. 143: 221-227.
- 7.- AUTRAN J. C., 1991.- Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. Tec et Doc, Paris: 115-137.
- 8.- BANGOOD S., 1984.- Chemical composition of major date cultivars groin in the United Arab Emirats, Date palm journal, vol. 3: 381-394.
- 9.- BARKHATOV V. et ELISSEEV V., 1979.- Guide des travaux pratiques du contrôle technico chimique de la production des conserves. Boumerdes: 23-41.
- 10.-BEUTLER B., 2004. - Innate immunity: an overview. Molecular Immunologic, vol.40:845–859.
- 11.-BIRINGANINE G., VRAY B., VERCRUYSSSE V., VANHAELEN-FASTRE R., VANHAELEN M. et DUEZ P., 2004.- Polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago palmata* Hook induce nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by interferon- $\gamma$ -activated macrophages. Nitric oxide, vol. 12: 1-8.
- 12.-BLUMENKRANTZ N. et ASBOE-HANSEN G., 1973.- New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical biochemistry, vol. 54: 484-489.

- 13.-BOUAL Z., KEMASSI A., MICHAUD P. et OULD EL HADJ M. D., 2011.- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius* (Lilliaceae) et l'étude de l'effet prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides. Algerian journal of arid environment, vol. 1 (2): 52-60.
- 14.-BOUDHIOUA N., BEN SLIMEN I., BAHLOUL N. et KECHAOU N., 2008.- Etude du séchage par Infrarouge de feuilles d'olivier d'origine tunisienne. Revue des Energies Renouvelables SMSTS, vol. 08 :111 – 116.
- 15.-BRADFORD M. M., 1976.- A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical biochemistry, vol. 72: 248-254.
- 16.-BRUMMER Y., CUI W. et WANG Q., 2003.- Extraction, purification and physicochemical characterization of fenugreek gum. Food Hydrocolloids, vol.17: 229-236.
- 17.-BUCKERIDGE M., SANTOS H. P., TINE M. A., 2000- Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. Plant physiology, Biochemical, vol. 38: 141–156.
- 18.-CAI W., GU X., TANG J., 2008.- Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. Carbohydrate Polymers, vol. 71: 403-410.
- 19.-CALIS I., DONMEZ A. A., PERRONE A., PIZZA C., et PIACENTE S., 2008.- Cycloartane glycosides from *Astragalus campylosema* Boiss. ssp. *Campylosema*. Phytochemistry, vol. 69: 2634–2638.
- 20.-CERQUEIRA M. A., SOUZA B. W. S., SIMOES J., TEIXEIRA J. A., DOMINGUES M. R. M., COIMBRA M. A., VICENTE A. A., 2011.- Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. Carbohydrate Polymers, vol. 83: 179–185.
- 21.-CHANG X.L., FENG Y.M., et WANG W.H., 2011.- Comparison of the polysaccharides isolated from skin juice, gel juice and flower of *Aloe arborescens* tissues. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, vol. 42:13–19.
- 22.-CHATAIGNÉ G., 2007.- Détermination structurale des lipopolysaccharides de surface chez *Sinorhizobium*. Thèse de doctorat, Université de toulouse, 208p.
- 23.-CHEN J., LIANG R. H., TI LI W. L., LIU CH. M., WU SH. SH., WANG Z. J., 2013.- Pectic-oligosaccharides prepared by dynamic high-pressure microfluidization and their in vitro fermentation properties. Carbohydrate Polymers, vol. 91: 175–182.



- 24.-CHEN Z. G., ZHANG D. N., ZHU Q., YANG Q. H., HAN Y. B., 2014.- Purification, preliminary characterization and in vitro immunomodulatory activity of tiger lily polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 106: 217–222.
- 25.-CHESNEAU, 2002.- Travaux pratiques de microbiologie: Les protéines de virulence de *Staphylococcus aureus*. Éduscol, France : 1-19.
- 26.-CHO W. C. S. et LEUNG K. N., 2007.- *In vitro* and *in vivo* immunomodulating and immunorestorative effects of *Astragalus membranaceus*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 113: 132-141.
- 27.-CIPRIANI T. R., MELLINGER C. G., SOUZA L. M., BAGGIO C. H., FREITAS C. S., MARQUES M. C. A., GORIN P. A. J., SASSAKI G. L. et IACOMINI M., 2009.- Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers*, vol.78: 361-363.
- 28.-CLEMENT C. et AUDRAN J. C., 1993.- Orbicule wall surface characteristics in *Lilium* (Lilliaceae) an ultrastructural and cytochemical approach. *Grana*, vol. 32: 318-353.
- 29.-CORRADINI C., BIANCHI F., MATTEUZZI D., AMORETTI A., ROSSI M., ZANONI S., 2004.- High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection and capillary zone electrophoresis with indirect ultra violet detection as powerful tools to evaluate prebiotic properties of fructooligosaccharides and inulin. *Journal of Chromatography A*, vol. 1054: 165–173.
- 30.-COSTABILE M, 2010.- Measuring the 50% Haemolytic Complement (CH50) Activity of Serum. *Journal of visualized Experiments*, vol. 37: 623-636.
- 31.-COURTOIS J., 2009.- Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, vol.12: 261–273.
- 32.-CRAEYVELD V. V., DELCOUR J. A., et COURTIN CH. M., 2009.- Extractability and chemical and enzymic degradation of psyllium (*Plantago ovata* Forsk) seed husk arabinoxylans. *Food Chemistry*, vol. 112: 812–819.
- 33.-CRITTENDEN R. G. et PLAYNE M. J., 2002.- Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 58: 297–302.
- 34.-DA SILVA J.A.L. et GONÇALVES M.P., 1990.- Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, vol. 4: 277-287.

- 35.-DAKIA P.A., BLECKER CH., ROBERT CH., WATHELET B., PAQUOT M., 2008.- Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, Vol. 22: 807-818.
- 36.-DAVIES A., SIMMONS D., HALE G., HARRISON R. A., TIGHE H., LACHMANN P. J., WALDMANN H., 1989.- CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 170:637–654.
- 37.-DETERS A. M., LENGSELD CH., HENSEL A., 2005.- Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 102: 391–399.
- 38.-DETERS A., ZIPPEL J., HELLENBRAND N., PAPPAI D., POSSEMEYER C., et HENSEL A., 2010.- Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althea officinalis* L.): Cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.127: 62–69.
- 39.-DIALLO D., PAULSEN B. S., LILJEBACK T.H. A. et MICHAELSEN T. E., 2001.- Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. Et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, vol.74: 159-171.
- 40.-DIALLO D., PAULSEN B. S., LILJEBACK T. H. A., et MICHAELSEN T. E., 2003.-The malian medicinal plant *Trichilia emetica*; studies on polysaccharides with complement fixing ability. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 84: 279-287.
- 41.-DIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H., TRAORE A., COULIBALY K. et MAIGA A., 2004.- Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Chimie*, vol. 7: 1073–1080.
- 42.-DIAZ MEDINA E. M., RODRIGUEZ RODRIGUEZ E. M., DIAZ ROMERO C. 2007.- Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, vol. 103: 38–45.
- 43.-DJERIDANE A., 2008.- Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la Carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure, Kouba-Alger, 176p.

- 44.-DOASSEM J., 2002.- Fabrication artisanale de la poudre d'oignon. Technologie alimentaire, Fiche Technique 20 : 1-2.
- 45.-DRAYTON, D. L., LIAO S., MOUNZER R. H., RUDDLE N. H., 2006.- Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology*, vol. 7: 344–353.
- 46.-DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., PEBERS P. A., et SMITH F., 1956.- Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- 47.-EBRINGEROVA A., KARDOSOVA A., HROMADKOVA Z. et HRIBALOVA V., 2003.- Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, vol. 74: 52–61.
- 48.-ELEGAMI A. A., ALMAGBOUL A. Z., OMER M. E. A., EL TOHAMI M. S., 2001.- Sudanese plants used in folkloric medicine: screening for antibacterial activity Part X. *Fitoterapia* , vol. 72 : 810-817.
- 49.-FEMENIA A., SANCHEZ E. S., SIMAL S. et ROSSELLO C., 1999.- Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate polymers*, vol. 39: 109–117.
- 50.-FIGUEIRO S. D., GOES J. C., MOREIRA R. A., et SOMBRA A. S. B., 2004.- On the physicochemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan– collagen films. *Carbohydrate Polymers*, vol. 56: 313–320.
- 51.-FLEER H., VERSPOHL E. J., 2007.- Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, vol. 14: 409–415.
- 52.-FREIJE A., ALKHUZAI J., AL-LAITH A., 2013.- Fatty acid composition of three medicinal plants from Bahrain: New potential sources of  $\gamma$ -linolenic acid and dihomogamma-linolenic. *Industrial Crops and Products*, vol. 43 : 218– 224.
- 53.-FREMEAUX B. V., NGO S., BORDEREAU P., POULAIN N., RONCELIN S., BLOUIN J., ROUMENINA L. T. et AGNÈS M. D. D., 2012.- Exploration du complément : actualités 2012, *Revue Francophone des laboratoires*. N°444 : 31 - 37.
- 54.-GASQUE P., LEGOEDEC L., THOMAS A., SCHOUFT M. T., CHAN P. et FONTAINE M., 1996.- Nouvelles fonctions pour le système du complément. Apport de l'étude des synthèses locales. *Journal de médecine/sciences*, vol. 12: 941- 947.

- 
- 55.-GENESTIE B., 2006.- Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales: Approches méthodologiques. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, 265p.
- 56.-GHEDIRA K., GOETZ P., LE JEUNE R., 2008.- *Plantago major* L. et *Plantago lanceolata* L. (Plantaginaceae). Phytothérapie, vol. 6: 367–371.
- 57.-GOETZ P., 2004.- Les plantes immunostimulantes adjuvantes de la thérapeutique antitumorale. Phytothérapie, vol. 6 : 180-182.
- 58.-GOLDBER R., 1969.- Etude des polysaccharides de réserve de deux graines de Liliacees: *Asparagus officinalis* L., et *Endymion nutans dumort*. Phytochemistry, Vol. 8 : 1783-1792.
- 59.-GOULAS A., TZORTZIS G., GIBSON G. R., 2007.- Development of a process for the production and purification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactooligosaccharides from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. International Dairy Journal, vol. 17: 648–656.
- 60.-GRACE O. M., DZAJIC A., JAGER A. K., NYBERG N. T., ONDER A., RONSTED N., 2013.- Monosaccharide analysis of succulent leaf tissue in *Aloe*. Phytochemistry, vol. 93: 79–87.
- 61.-GRAY R. J. CHASE M. W., et SIMMONDS M. S.J., 1999.- A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of hegnauer's. Biochemistry systematic ecology, vol. 27: 369-393.
- 62.-GRUCHALLA R.S. et JONES J., 2003.- Combating high-priority biological agents: what to do with drug-allergic patients and those for whom vaccination is contraindicated? Journal of Allergy and Clinic Immunology, vol.112:675– 82.
- 63.-GUIRAUD J. P., 1998.- Microbiologie Alimentaire. Edition Dunod, Paris, 696p.
- 64.-GUO Q., CUI S.W., WANG Q. et YOUNG J.C., 2007.- Fractionation and Physicochemical Characterization of Psyllium Gum. Carbohydrate Polymers, vol. 3614:11-37.
- 65.-GURIB-FAKIM A., 2006.- Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93.
- 66.-HACKETT C.J., 2003.- Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: prospects and research challenges. Journal of Allergy Clinic Immunologic, vol. 112:686– 94.
- 67.-HAMMICHE H. et MAIZA K., 2006.- Traditional medicine in central sahara: pharmacopoeia of tassili n'ajjer. Journal of ethnopharmacology, vol. 105: 358-367.

- 68.-HAMURCU M., MUSA OZCAN M., DURSUN N., GEZGIN S., 2010.- Mineral and heavy metal levels of some fruits grown at the roadsides. *Food Chem. Toxicol*, vol. 48: 1767-1770.
- 69.-HANNAN J.M.A., ALI L., KHALEQUE J., AKHTER M., FLATT P. R., et ABDEL-WAHAB Y.H.A., 2006.- Aqueous extracts of husks of *Plantago ovata* reduce hyperglycaemia in type 1 and type 2 diabetes by inhibition of Intestinal glucose absorption. *Britanic journal of Nutrition*, vol.96:131-137.
- 70.-HARBORNE J. B. et WILLIAMS C. A., 1994.- Recent advances in the chemosystematics of the monocotyledons. *Phytochemistry*, Vol. 37: 3-18.
- 71.-HART L.A., NIBBERING P.H., VAN DEN BARSELAAR M.TH., VAN DIJK H., VAN DEN BERG A.J.J., et LABADIE R.P., 1988.- Effects of low molecular constituents from *Aloe vera* gel on oxidative metabolism and cytotoxic and bactericidal activities of human neutrophils. *International Journal of Immunopharmacology*, vol. 12: 427-434.
- 72.-HERNANDEZ-HERNANDEZ O., MUTHAIYAN A., MORENO F.J., MONTILLA A., SANZ M.L., et RICKE S. C., 2012.- Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30: 355-361.
- 73.-HROMADKOVA Z., PAULSEN B. S., POLOVKA M., KOSTALOVA Z., EBRINGEROVA A., 2013.- Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 93: 22-30.
- 74.-HU J. L., NIE S. P., LI CH., et XIE M. Y., 2013a.- *In vitro* fermentation of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. by human fecal microbiota. *Food Hydrocolloids*, vol. 33: 384-392.
- 75.-HU J. L., NIE SH. P., LI CH., et XIE M.Y., 2013b.- *In vitro* effects of a novel polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. on intestinal function. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 54: 264-269.
- 76.-HU J. L., NIE SH. P., MIN F. F., et XIE M. Y., 2013c.- Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. *Carbohydrate Polymers*, vol. 92:1143-1150.
- 77.-HUANG D.J., LIN C.D., CHEN H. J. et LIN Y. H., 2004.- Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam ‘Tainong 57’) constituents *Bot. Bull. Acad. Sin.*, vol. 45: 179-186.

- 78.-IBANEZ M. C. et FERRERO C., 2003.- Extraction and characterization of the hydrocolloid from *Prosopis flexuosa* DC seeds. Food Research International, vol. 36: 455–460.
- 79.-JABEEN N. et AHMED M., 2009.- Possible allelopathic effects of three different weeds on germination and growth of maize (*Zea mays*) cultivars. Pakistan Journal of Botany, vol. 41(4): 1677-1683.
- 80.-JAKIMOW-BARRAS N., 1973.- Les polysaccharides des graines de quelques liliacées et iridacées. Phytochemistry, vol. 12: 1331-1339.
- 81.-JAMES L. F., HARTELY W. J., VAN KAMPEN K. R., 1981.- Syndromes of *Astragalus* poisoning in livestock, J. Am. Vet. Med. Assoc., vol.178 (2): 146- 150.
- 82.-JIN L. Q., ZHENG Z. J., Peng Y., Li W. X., Chen X. M., et Lu J. X., 2007.- Opposite effects on tumor growth depending on dose of *Achyranthes bidentata* polysaccharides in C57BL/6 mice. International Immunopharmacology, vol. 7: 568–577.
- 83.-JOHANDIEZ E., MAIRE R., 1932.- Catalogue des plantes du Maroc Tome 2. Imprimerie Minerva, Alger, 406p.
- 84.-JOHANSSON L., VIRKKI L., ANTTILA H., ESSELSTROM H., TUOMAINEN P. et SONTAG-STROHM T., 2006.- Hydrolysis of  $\beta$ -glucane. Food Chemistry, vol. 97: 71–79.
- 85.-JOSEPH M. M., ARAVIND S. R., GEORGE S. K., VARGHESE SH., SREELEKHA T.T., 2013.- A galactomannan polysaccharide from *Punica granatum* imparts *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. Carbohydrate Polymers, vol. 98: 1466-1475.
- 86.-JURISIC GRUBESIC R., VUKOVIC J. , KREMER D., et VLADIMIR-KNEZEVIC S., 2005.- Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on *Plantago* L. species. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39: 837–842.
- 87.-KABAT E. A., et MAYER, M. M., 1961.- Experimental Immunochemistry, 2nd edition. Thomas, Springfield, Illinois.
- 88.-KAMERLING J.P., GERWIG G.J., Vliegenthart J.F. et CLAMP J.R., 1975.- Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. Biochemistry journal, vol.151, 491-495.

- 89.-KAMERLING L., BOONS G. L., LEE Y. C., SUZUKI A., TANIGUCHI N. et VORAGEN A., 2007- Comprehensive glycoscience. Ed. Elsevier, vol. 2, Paris: 654-681.
- 90.-KATAYAMA H., TAKANO R., et SUGIMURA Y., 2008.- Localization of mucilaginous polysaccharides in mulberry leaves. *Protoplasma*, vol. 233: 157–163.
- 91.-KIYOHARA H., CYONG J.CH., et YAMADA H., 1988.- Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Carbohydrate Research*, vol. 182: 259-275.
- 92.-KIYOHARA H., UCHIDA T., TAKAKIWA M., MATSUZAKI T., HADA N., TAKEDA T., SHIBATA T., et YAMADA H. 2010.- Different contributions of side-chains in b-D-(1→3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge. *Phytochemistry*, vol. 71: 280–293.
- 93.-KÖK M.S., HILL S.E. et MITCHELL J.R., 1999.- Viscosity of galactomannanes during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. *Food Hydrocolloids*, vol. 13, 535-542.
- 94.-KUMAR P., SAINGH V., MISHRA U. CH., et GUPTA P. CH., 1990.- A water-soluble polysaccharide isolated from seeds of *Cassia owata*. *Carbohydrate Research*, vol. 198: 384-386.
- 95.-KUO Y. H., TSAI W. J., LOKE S. H., WU T. S., CHIOU W. F., 2009.- Astragalus membranaceus flavonoids (AMF) ameliorate chronic fatigue syndrome induced by food intake restriction plus forced swimming. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 122: 28-34.
- 96.-KURT A. et KAHYAOGU T., 2014.- Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan. *Carbohydrate Polymers*, vol.104: 50–58.
- 97.-LACROIX J et TUCCI M. 2011.- Impact clinique de la durée de conservation des globules rouges avant transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique*, vol. 18: 97-105.
- 98.-LAMAISON J.L.C. et CARNET A., 1990.- Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* en fonction de la végétation. *Pharmaceutical Acta*. Vol. 65 : 315-320.
- 99.-LARPENT J. P., 1990.- Biotechnologie des levures. Ed. Masson, Paris: 419p.
- 100.- LARSSON S., 2007.- The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. *Phytochemistry*, vol. 68 : 2903-2907.

- 101.- LAZARIDOU A., BILIADERIS C.G. et IZYDORCZYK M.S., 2000.- Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, 68-75.
- 102.- LI J., YE T., WU X., CHEN J., WANG SH., LIN L., LI B., 2014.- Preparation and characterization of heterogeneous deacetylated konjac glucomannan. *Food Hydrocolloids*, vol. 40: 9-15.
- 103.- LI Q., XIE Y., SU J., YE Q., et JIA Z. 2012.- Isolation and structural characterization of a neutral polysaccharide from the stems of *Dendrobium densiflorum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 50: 1207–1211.
- 104.- LI S., ZHANG Y., ZHAO J., 2007.- Preparation and suppressive effect of *Astragalus* polysaccharide in glomerulonephritis rats. *International Immunopharmacology*, vol. 7: 23–28.
- 105.- LI. SH. G. et ZHANG Y. Q., 2009.- Characterization and renal protective effect of a polysaccharide from *Astragalus membranaceus*. *Carbohydrate Polymers*, 78: 343–348.
- 106.- LIM D. H., CHOI D., CHOI O. Y., CHO K. A., KIM R., CHOI H. S., CHO H., 2011.- Effect of *Astragalus sinicus* L. seed extract on antioxidant activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol.17: 510–516.
- 107.- LIU J.Y., HU J.H., et ZHU Q.G., 2007.- Effect of matrine on the expression of substance P receptor and inflammatory cytokines production in human skin keratinocytes and fibroblasts. *International Immunopharmacology*, vol. 7: 816–823.
- 108.- MABUSELA W. T., STEPHEN A. M. et BOTHA M. C., 1990.- Carbohydrate polymers from *Aloe ferox* leaves. *Phytochemistry*, vol. 29 (11): 3555-3558.
- 109.- MADHAVA NAIDU M., SHYAMALA B.N., PURA NAIK J., SULOCHANAMMA G., SRINIVAS P. 2011.- Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Food Science and Technology*, vol. 44: 451-456.
- 110.- MAHMOOD A., SHAHEEN H., QURESHI R. A., SANGI Y., et GILANI S. A., 2011.- Ethno medicinal survey of plants from district Bhimber Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 5(11): 2348-2360.



- 111.- MAO C. et CHEN J.C., 2006.- Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions: an interpretation based on thixotropic behavior. *Food Hydrocolloids*, vol. 20, 730-739.
- 112.- MARLES R. J. et FARNSWORTH N. R., 1995.- Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*, vol. 2 (2): 137-189.
- 113.- MARTEL C. 2009.- Rôles physiopathologiques du complément dans le syndrome coronarien aigu et implications thérapeutiques. Thèse du diplôme de Doctorat, Montréal, 30p.
- 114.- MATSUHIRO B., LILLO L. E., SAENZ C., URZUA C. C., ZARATE O., 2006.- Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydrate Polymers*, vol. 63: 263–267.
- 115.- METIN M. et BURUN B., 2010.- Effects of the High Doses of *Urginea maritima* (L.) Baker Extract on Chromosomes. *CARYOLOGIA*, vol. 63(4): 367-375.
- 116.- MEZZETI T., LATOM., RUFINI S. et CIUFFINI G., 1971.- Thin layer chromatography of oligosaccharides with tungstic or molybdic acid as impregnant. *Journal of chromatography, Chrom*, 5547: 329-342.
- 117.- MICHAELSEN T. E., GILJE A., SAMUELSEN A. B., HEGAENSEN K. et PAULSEN B. S., 2000.- Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L., *Scandinavian Journal of Immunology*. Blackwell Science, vol. 52: 483-490.
- 118.- MIRHOSSEINI H. et AMID B. T., 2012.- A review study on chemical composition and molecular structure of newly plant gum exudates and seed gums. *Food Research International*, vol. 46: 387-398.
- 119.- MONSIGNY M., PETIT C. et ROCHE A. C., 1988.- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. *Analytical biochemistry*, vol. 175: 525-530.
- 120.- MONTREUIL J., BOUQUELET S., DEBRAY H., FOURNET B., SPIK G. et STRECKER G., 1986.- Glycoproteins. In: *Carbohydrate analysis: a practical approach*. Chaplin M.F. and Kennedy J.K. (Eds), Oxford: IRL Press., pp. 143-204.
- 121.- MONTREUIL J., SPIK G., CHOSSON A., SEGARD E., SCHEPPLER N., 1963.- Methods of study of the structure of glycoproteins. *J. Pharm. Bel.*, vol.18: 529-546.
- 122.- MORRISON I. M. et STEWART D., 1998.- Plant cell wall fragments released on solubilisation in trifluoroacetic acid. *Phytochemistry*, vol. 49 (6): 1555-1563.

- 123.- MORRISON I. M., 1988.- Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochemistry*, vol. 27(4): 1097-1100.
- 124.- MORTON J. F., 1990.- Mucilaginous plants and their uses in medicine. *Journal of ethnopharmacology*, vol. 29: 245-266.
- 125.- MUANDA F.N., DICKO A., et SOULIMANI R., 2010.- Assessment of polyphenolic compounds, *in vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of *Securidaca longepedunculata* root barks. *Comptes Rendus Biologies*, vol. 333: 663–669
- 126.- MUKHTAR M., ARSHAD M., AHMAD M., POMERANTZ R. J., WIGDAHL B., PARVEEN Z., 2008.- Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, vol. 131: 111–120.
- 127.- NAHM M. H. et BURTON R. L. 2011.- Protocole pour le test multiplex d'opsonophagocytose et de destruction (UABMOPA) du Pneumocoque par les anticorps. *Bacterial Respiratory Pathogen Reference Laboratory*: 1-47.
- 128.- NERGARD C. S., DIALLO D., MICHAELSEN T. E., MALTERUD K. E., Kiyohara H., MATSUMOTO T., YAMADA H., PAULSEN B. S. 2004.- Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 91: 141–152.
- 129.- NIELSON D. B., 1978.- The economic impact of poisonous plants on the range livestock industry in the 17 western states. *J. Range Mana*, 31: 325- 328.
- 130.- NIU Y., WANG H., XIE Z., WHENT M., GAO X., ZHANG X., ZOU SH., YAO W., YU L., 2011.- Structural analysis and bioactivity of a polysaccharide from the roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao. *Food Chemistry*, vol.128: 620–626.
- 131.- OMS, 2003.- Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 1-76.
- 132.- ONYEIKE, E.N., OLUNGWE, T., et UWAKWE, A. A., 1995.- Effect of Heat Treatment and Defatting on the Proximate Composition of Some Nigerian Local Soup Thickners, *Food Chem*. 53:173 – 177.
- 133.- OULD EL HADJ M. D., HADJ- MAHAMMED M., ZABEIRROU H., et CHEHMA A., 2003.- Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional Est algérien). *Annales de l'INRAT*, vol. 76: 225-240.

- 134.- OZENDA P., 2004.- Flore du Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 622 p.
- 135.- PALFRAMAN R. J., GIBSON G. R. ET RASTALL R. A., 2002.- Effect of pH and dose on the Growth of Gut Bacteria on Prebiotic Carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe*, vol. 8: 287–292.
- 136.- PALMESE M. T., UNCINI MANGANELLI R. E., TOMEI P. E., 2001.- An ethno-pharmacobotanical survey in the Sarrabus district (south-east Sardinia). *Fitoterapia*, vol. 72: 619-643.
- 137.- PAN Y. C. et LEE, W. C., 2005.- Production of high-purity isomaltooligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol Bioeng*, vol. 89: 797–804.
- 138.- PANDURANGA MURTHY G., MAMTHARANI D.R., TEJAST.S. et SUARLIKERIMATH N. M., 2011.- Phytochemical analysis, *in vitro* anti-bacterial and antioxidant activities of wild onion sps. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, vol. 2:230-237.
- 139.- PASCUAL-VILLALOBOS M.J., ROBLEDO A., 1998.- Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products*, vol. 8: 183–194.
- 140.- PEKSEL A., ALTAS-KIYMAZ N. ET IMAMOGLU S., 2012.- Evaluation of antioxidant and antifungal potential of *Asphodelus aestivus* Brot. growing in Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6(2): 253-265.
- 141.- PERE J. P., 1999.- Techniques spectroscopiques en biochimie analytique. Centre Régionale de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, 150p.
- 142.- POLAT E., CALISKAN-ALANKUS O., PERRONE A., PIACENTE S., et BEDIR E. 2009.-Cycloartane-type glycosides from *Astragalus ambleolepis*. *Phytochemistry*, vol. 70 : 628–634.
- 143.- POLYCARPOS P., 2009.- Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*. *Renewable Energy*, vol. 34: 2525–2527.
- 144.- POPOVA M., BANKOVA V., BUTOVSKA D., PETKOV V., NIKOLOVA-DAMYANOVA B., SABATINI A. G., MARCAZZAN G. L., ET BOGDANOV S., 2004.- Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem. Analysis*, vol. 15 (4), 235-240.
- 145.- PRADO B. M., KIM S., OZEN B. F., et MAUER L. J., 2005.- Differentiation of carbohydrate gums and mixtures using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53: 2823–2829.

- 146.- PRAMANIK S. et SEN RAYCHAUDHURI S., 1997.- DNA Content, Chromosome Composition, and Isozyme Patterns in *Plantago* L. The botanical review, vol. 63, 124- 139.
- 147.- PRAZNIK W. et SPIES T., 1993.- Fructo-oligosaccharides from *Urginea maritima*. Carbohydrate Research, vol. 243: 91-97.
- 148.- PRIETO P., PINEDA M., et AGUILLAR M., 1999.- Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269: 337-341.
- 149.- QUEZEL P. et SANTA S., 1962-1963 - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS Paris. Vol. 1 et 2, 1170 p.
- 150.- QURESHI R., BHATTI G. R., 2008.- Ethnobotany of plants used by the Thari people of Nara Desert, Pakistan. Fitoterapia, vol. 79: 468–473.
- 151.- RAI M. and CARPINELLA M. C., 2006.- Advances in Phytomedicine Series, Volume Three, Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier, 515p.
- 152.- RAJALINGAM D., LOFTIS C., XU J. J., et KRISHNASWAMY T. S. K., 2009.- Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate. protein science, Vol 18:980-993.
- 153.- RAVN H., NISHIBE S., SANHARA M. et XUEBO L., 1990.- Phenolic compounds from *Plantago asiatica*. Phytochemistry, vol. 29: 3627-3631.
- 154.- RAYNAUD C., 1982.- Eléments pour une flore pratique du Maroc, légumineuses, tribu des galegea. Ecole Nationale Forestière des Ingénieurs, Salé, Maroc, 76 p.
- 155.- RENAUD M., BELGACEM M. N., RINAUDO M., 2005.- Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions. Polymer, vol. 46: 12348–12358.
- 156.- RENDON-HUERTA J. A., JUAREZ-FLORES B. I. , PINOS-RODRÍGUEZ J. M., AGUIRRE-RIVERA J. R. et DELGADO-PORTALES R. E. 2011.- Effects of different kind of fructans on *in vitro* growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*. African Journal of Microbiology Research, vol. 5 (18): 2706-2710.
- 157.- RIZZO V., 2004.- Rheological properties and sugar composition of locust bean gum from different carob varieties (*Ceratonia siliqua* L.). J. Agric. Food Chem., vol. 52: 7925-7930.

- 158.- ROGER O., 2002.- Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 13: 197p.
- 159.- RUIZ G., 2005- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 256p.
- 160.- RUIZ-MATUTE A. I., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ O., RODRIGUEZ-SANCHEZ S., SANZ M.L.et MARTINEZ-CASTRO I., 2011.- Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses. *Journal of Chromatography B*, vol. 879: 1226–1240.
- 161.- RUMPEL C. et DIGNAC M. F., 2005.- Gaz chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profil: Analysis by gaz chromatography after trifluoacetic acide hydrolysis and reduction-acetylation. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 38: 1478-1481.
- 162.- SAAD N., DELATTRE C., URDACI M., SCHMITTER J. M., BRESSOLLIER P. 2013.- An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*, vol. 50: 1-16.
- 163.- SAFDER M., MEHMOODA R., ALIA B., MUGHALA U. R., MALIK A., et JABBAR A., 2012.- New Secondary Metabolites from *Asphodelus tenuifolius*. *Helvetica Chimica Acta*, vol. 95:144-151.
- 164.- SAFDER M., RIAZ N., IMRAN M., NAWAZ H., MALIK A., et JABBAR A., 2009.- Phytochemical studies on *Asphodelus tenuifolius*. *J. Chem. Soc. Pak.*, vol. 3: 122-125.
- 165.- SAGAR A.J. et PANDIT M.W., 1983.- Denaturation studies on bovine pancreatic ribonuclease. Effect of trichloroacetic acid. *Biochimistry and Biophysic Acta*, vol. 743:303–309.
- 166.- SAID O., KHALIL K., FULDER S., AZAIZEH H., 2002.- Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 83:251-265.
- 167.- SAMUELSEN A. B., 2000.- The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 71: 1-21.
- 168.- SAMUELSEN A. B., COHEN E. H., PAULSEN B. S., BRULL L. P., THOMAS-OATES J. E., 1999a.- Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* L. seeds by partial hydrolysis, HPAEC-PAD, methylation and GC–MS, ESMS and ESMS:MS. *Carbohydrate Research*, vol. 315: 312–318.

- 169.- SAMUELSEN A. B., LUND I, DJAHROMI J. M., PAULSEN B S., WOLD J. K. et KNUTSEN S. H., 1999b.- Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. Carbohydrate Polymers, vol. 38: 133-143.
- 170.- SAMUELSEN A. B., PAULSEN B. S., WOLD J. K., OTSUKA H., YAMADA H. et ESPEVIK T., 1995.- Isolation and partial characterization of biologically active polysaccharides from *Plantago major* L. Phytotherapy Research, vol. 9, Issue 3: 211- 218.
- 171.- SAMUELSEN A.B., PAULSEN B.S., WOLD J.K., OTSUKA H., KIYOHARA H., YAMADA H. et KNUTSEN S.H., 1996.- Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L. Carbohydrate polymer, vol. 30: 37-44.
- 172.- SANDHU J.S., HUDSON G. J., et KENNEDY J. F., 1981.-The gel nature and structure of the carbohydrate of ispaghula husk ex *Plantago ovata* Forsk. Carbohydrate Research, vol. 93: 247-259.
- 173.- SCHEPETKIN I. A. et QUINN M. T. 2006- Botanical polysaccharides : Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. Review of International Immunopharmacology, vol. 6: 317-333.
- 174.- SEPULVEDA E., SAENZ C., ALIAGA E., et ACEITUNO C., 2007.- Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. Journal of arid environments, vol. 68: 534–545.
- 175.- SHAPIRO Y. E., 2013.- NMR spectroscopy on domain dynamics in biomacromolecules. Progress in Biophysics and Molecular Biology, vol. 112, 58-117.
- 176.- SHARAF A.T., SAWIDIS T., DIANNELIDIS B.E., et DELIVOPOULOS S., 2006.- Anatomical studies on the adventitious roots of the geophyte *Urginea maritime* (L.) Baker. Journal of Biological Research, vol. 5: 61-70.
- 177.- SINGH A., KIRUBAKARAN S. I., et SAKTHIVEL N. 2007.- Heterologous expression of new antifungal chitinase from wheat. Protein Expression and Purification, vol. 56: 100–109.
- 178.- SINGH V. et MALVIYA T., 2006.- A non-ionic glucomannan from the seeds of an indigenous medicinal plant: *Bryonia lacinosa*. Carbohydrate Polymers, 64 : 481–483.
- 179.- STRONG W. M., LEA D. J. et WARD D. J., 1978.- Measurement of total haemolytic complement activity in body fluids. Journal of Clinical Pathology, vol. 31: 527- 530.

- 180.- SUMITA J. et SUMITRA S., 1981.-STEROLS IN DIFFERENT CYTOLOGICAL RACES OF URGINEA INDICA. *Phytochemistry*, vol. 20, No. 6: 1442.-1443.
- 181.- SYNITSYA A., MICKOVA K., SYNITSYA A., JABLONSKY I., SPEVACEK J., ERBAN V., KOVARIKOVA E., OPIKOVA J., 2009.- Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, vol. 76: 548–556.
- 182.- TALAGA P., VIALLE S.et MOREAU M., 2002.- Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. *Vaccine*, vol. 20: 2474-2484.
- 183.- TALARICO L.B. , PUJOL C.A., ZIBETTI R.G.M., FARÍA P.C.S., NOSEDA M.D., DUARTE M.E.R., et DAMONTE E.B., 2005.- The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Research*, Vol. 66:103-110.
- 184.- TASKOVA R. M., GOTFREDSEN CH. H., et JENSEN S. R., 2006.- Chemotaxonomy of *Veroniceae* and its allies in the *Plantaginaceae*. *Phytochemistry* 67: 286–301.
- 185.- TISSOT J. D., CANELLINI G. E. et S WALDVOGEL., 2011.- *Immuno-hématologie bases de médecine transfusionnelle* (Cinquième édition), 28p.
- 186.- TOMODA M. et UNO M., 1971.- Plant mucilages. I. Isolation and property of a mucous polysaccharide, plantasan, from *Plantago major* var *asiatica* seeds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 19, 1214-1217.
- 187.- TONG H., LIANG Z., et WANG G. 2008.- Structural characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Physalis alkekengi* L., *Carbohydrate Polymers*, Vol.71:316-323.
- 188.- TRABUT L., 1935.- Flore du nord de l'Afrique (répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique. La typolitho et Juies carbonel reunies, Alger: 37- 271.
- 189.- TZIANABOS A.O., 2000.- Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clinic Microbiology Revue*, 13, 523– 33.
- 190.- VAN LAERE K. M. J., HARTEMINK R., BOSVELD M., SCHOLS H. et VORAGEN A.,2000.-Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and

- their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48 : 1644-1652.
- 191.- VAN SOEST P.J. et ROBERTSON J. B., 1979.- Systems of analysis evaluating fibrous feeds. Cornell University, Ithaca, N.Y.: 01-30.
- 192.- VELASCO-LEZAMA R., TAPIA-AGUILAR R., ROMAN-RAMOS R., VEGA-AVILA E., PEREZ-GUTIERREZ M. S., 2006.- Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103: 36–42.
- 193.- VOISIN A., 1987- Utilisation des plantes médicinales dans le souf au 19 ème siècle. Le sahara, 1er trimestre, vol. 100:25-28.
- 194.- WANG C., CHANG S. C., et CHEN B. H., 2009.- Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus. *Food Chemistry*, vol. 116: 595–603.
- 195.- WANG L., HONGBIN Z., Z XIAOYAN. et CHEN Z., 2008.- Purification and identification of a novel heteropolysaccharide RBPS2 a with anti-complementary activity from defatted rice bran. *Food Chemistry*, vol. 110: 150 - 155.
- 196.- WANG Q. et FANG Y., 2004- Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography b*, vol. 812: 309–324.
- 197.- WANG Q., KUANG H., SU Y., SUN Y., FENG J., GUO R., et CHAN K., 2013.- Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 146 : 9–39.
- 198.- WARRAND J., 2004.- Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs de mucilage de lin (*Linum usitatissimum*). Thèse de Doctorat, Université de Picardie jules verne, 238 p.
- 199.- WASSER S.P., 2002. - Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 60:258–74.
- 200.- WOZNIEWSKI T., BLASCHEK W. et FRANZ G., 1991.- *In vitro* biosynthesis of a reserve glucomannan from *Lilium testaceum*. *Phytochemistry*, vol. 30 (11): 3579-3583.
- 201.- WU Y., CUI S. W., TANG J., Wang Q. et GU X., 2007.- Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited *Sterculia* seeds. *Carbohydrate polymers*, vol. 70: 437–443.
- 202.- WU Y., CUI W., ESKIN N.A.M., et GOFF H.D., 2009.- Fractionation and partial characterization of non-pectic polysaccharides from yellow mustard mucilage. *Food Hydrocolloids*, vol. 23: 1535–1541.



- 203.- XI Z., CHEN W., WU Z., WANG Y., ZENG P., ZHAO G., LI X. et SUN L., 2012.- Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. Food Chemistry, vol. 130: 165-170.
- 204.- XIE G., SCHEPETKIN I. A. et QUINN M. T., 2007.- Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum Vulgare* L. International Immunopharmacology, vol. 7: 1639 - 1650.
- 205.- XU C., LUO L., et TAN R. X., 2004.- Antidepressant effect of three traditional Chinese medicines in the learned helplessness model. Journal of Ethnopharmacology, vol. 91: 345–349.
- 206.- XU H., ZHANG Y., ZHANG J. et CHEN D., 2007.- Isolation and characterization of an anti-complementary polysaccharide D3-S1 from the roots of *Bupleurum smithii*. International Immunopharmacology, vol. 7: 175 - 182.
- 207.- Xue B., Li J., Chai Q., Liu Zx, et Chen L. 2008.- Effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* R. Brown on angiotensin II-induced portal-vein contraction in hypertensive rats. Phytomedicine, vol. 15:759–762.
- 208.- YAMADA H., NAGAI T., CYONG J. C. et OTSUKA Y., 1986.- Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, plantago-mucilage a, from the seed of *Plantago asiatica*. Carbohydrate Research, vol. 156 : 137- 145.
- 209.- YAMADA H., RA K. S., KIYOHARA H., CYONG J. CH., et OTSUKA Y., 1989.- Structural characterisation of an anti-complementary pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. Carbohydrate Research, vol. 189: 209-226.
- 210.- YAMANE H., KONNO K., SABELIS M., TAKABAYASHI J., SASSA T., et OIKAWA H., 2010.- Chemical Defence and Toxins of Plants. Elsevier Ltd, 339-376.
- 211.- YANG L. et ZHANG L. M., 2009.- Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. Carbohydrate Polymers, vol. 76 : 349–361.
- 212.- YANG X., DONG M., HUANG Z., 2010.- Role of mucilage in the germination of *Artemisia sphaerocephala* (Asteraceae) achenes exposed to osmotic stress and salinity. Plant Physiology and Biochemistry, vol. 48 :131-35.
- 213.- YE CH.L., HU W.L., ET DAI D. H., 2011.- Extraction of polysaccharides and the antioxidant activity from the seeds of *Plantago asiatica* L. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 49:466– 470.

- 214.- YE Y.N., SO H.L., LIU E.S.L., SHIN V.Y., et CHO C.H., 2003.- Effect of polysaccharides from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing, Life Sciences, vol. 72: 925-932.
- 215.- YIN J., LIN H., LI J., WANG Y., CUI S. W., NIE S., et XIE M., 2012.- Structural characterization of a highly branched polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. Carbohydrate Polymers, vol. 87: 2416–2424.
- 216.- YOO S.H., KWEON M.R., KIM M. J., AUH J. H., JUNG D.S., KIM J.R., YOOK C., KIM J.W., et PARK K.H., 1995.- Branched oligosaccharides concentrated by yeast fermentation and effectiveness as a low sweetness humectant. Journal of Food Science, vol. 60: 516–519.
- 217.- YOON S.H., MUKERJEA R., et ROBYT F. J., 2003.- Specificity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in removing carbohydrates by fermentation. Carbohydrate Research, vol. 338: 1127–1132.
- 218.- YOU X., XIE C., LIU K., GU Z., 2010.- Isolation of non-starch polysaccharides from bulb of tiger lily (*Lilium lancifolium* Thunb.) with fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers, vol. 81 : 35–40.
- 219.- YUEN S.N., CHOI S. M., PHILLIPS D. L., et MA C.Y., 2009.- Raman and FTIR spectroscopy study of carboxymethylated non-starch polysaccharides. Food Chemistry, vol.114: 1091–1098.
- 220.- ZHANG C., CHEN J. D., YANG F. Q., 2014.- Konjac glucomannan, a promising polysaccharide for OCDDS. Carbohydrate Polymers, vol. 104: 175–181.
- 221.- ZHANG D., ONG Y.L., LI Z., WU J. CH., 2013a.- Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8. Biochemical Engineering Journal, vol. 72 : 77–82.
- 222.- ZHANG L., KOYYALAMUDI S. R., JEONG S.CH., REDDY N., BAILEY T., et LONGVAH T. 2013b.- Immunomodulatory activities of polysaccharides isolated from *Taxillus chinensis* and *Uncaria rhyncophylla*. Carbohydrate Polymers, vol. 98: 1458–1465.
- 223.- ZHANG M., CUI S. W., CHEUNG P. C., et WANG Q., 2007a.- Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends in Food Science & Technology, vol. 18, 4–19.

- 224.- ZHANG W., HE H., ZHANG X., 2007b.- Determination of neutral sugars in soil by capillary gas chromatography after derivatization to aldonitrile acetates. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 39: 2665–2669.
- 225.- ZHANG X. J., CHEN G. Z., KE M., HAN H., LU Z.W., WANG T. J., SUN F. H., YU H.Y., 2011.- A study on *Astragalus mongholicus* heterosaccharides affecting contractions of isolated bladder detrusor strips. *Carbohydrate Polymers*, vol. 85: 312–317.
- 226.- ZHAO J.F., KIYOHARA H., YAMADA H., TAKEMOTO N., et KAWAMURA H., 1991.- Heterogeneity and characterisation of mitogenic and anti-complementary pectic polysaccharides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch et D.C. *Carbohydrate Research*, vol. 219:149-172.
- 227.- ZHAO Q. C., KIYOHARA H. et YAMADA H., 1994.- Anti-complementary neutral polysaccharides from leaves of *Artemisia princeps*. *Phytochemistry*, vol. 35. N°1 : 73-77.
- 228.- ZHU J., LIU W., YU J., ZOU SH., WANG J., YAO W., GAO X., 2013.- Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Carbohydrate Polymers*, vol. 98:8– 16.
- 229.- ZHU Y., LI Q., MAO G., ZOU Y., FENG W., ZHENG D., WANG W., ZHOU L., ZHANG T., YANG J., YANG L., et WU X., 2014.- Optimization of enzyme-assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Polymers*, vol. 101:606-613.
- 230.- ZIMMERMANN U., WAGNER H. J., HEIDECKER M., MIMIETZ S., SCHNEIDER H., SZIMTENINGS M., HAASE A., MITLÖHNER R., KRUCK W., HOFFMANN R. et KÖNIG W., 2002.- Implications of mucilage on pressure bomb measurements and water lifting in trees rooting in high-salinity water. *Trees*, vol.16:100–111.
- 231.- ZONG A., CAO H., et WANG F., 2012.- Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, vol. 90 :1395– 1410.
- 232.- BRUDIEUX V., 2007.- Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges, 220p.

## *Annexes*

## Annexe 01

R<sub>f</sub> des hydrolysats de polysaccharides d'*A. armatus* dans le système 1

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
<b>0.5M à 80°C</b>			0.05	0.05	0.05	0.05
	0.36	0.05	0.12	0.12	0.12	0.12
	0.44	0.12	0.23	0.23	0.23	0.23
		0.36	0.25	0.25	0.25	0.25
		0.44	0.36	0.36	0.36	0.36
			0.44	0.44	0.44	0.47
<b>0.5M à 100°C</b>	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	0.33	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	0.39	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
		0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
<b>2M à 80°C</b>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07
	0.11	0.11	0.11	0.11	0.23	0.11
	0.23	0.23	0.23	0.23	0.32	0.23
	0.35	0.37	0.37	0.37	0.37	0.32
	0.44	0.44	0.44	0.44	0.41	0.36
			0.52	0.52	0.52	0.41
<b>2M à 100°C</b>	0.06	0.06	0.14			
	0.14	0.14	0.27	0.41	0.41	0.41
	0.27	0.27	0.41	0.47	0.47	0.47
	0.41	0.41	0.47	0.56	0.56	0.56
	0.47	0.47	0.56			
	0.56	0.56				
<b>4M à 80°C</b>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	
<b>4M à 100°C</b>	0.18	0.18	0.15	0.15	0.15	0.29
	0.23	0.23	0.29	0.29	0.29	0.37
	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.43
	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.50
	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	
	0.60	0.60				

## Annexe 02

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides d'*A.armatus* dans système 02.

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
<b>0.5M à 80°C</b>	0.12	0.52	0.06	0.06	0.06	0.06
	0.16		0.12	0.12	0.12	0.12
	0.23		0.18	0.18	0.18	0.18
	0.31		0.28	0.28	0.28	0.28
	0.43		0.37	0.37	0.37	0.37
	0.52		0.47	0.47	0.47	0.47
			0.52	0.52	0.52	0.52
<b>0.5M à 100°C</b>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.07	0.07
	0.07	0.07	0.07	0.07	0.13	0.13
	0.13	0.13	0.13	0.13	0.24	0.24
	0.24	0.24	0.24	0.24	0.35	0.35
	0.35	0.35	0.35	0.35	0.40	0.40
	0.40	0.40	0.40	0.40	0.48	0.48
	0.48	0.48	0.48	0.48		
<b>2M à 80°C</b>	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.11
	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	0.46	0.34	0.34	0.34	0.34	0.30
	0.56	0.46	0.46	0.46	0.46	0.40
		0.56	0.56	0.56	0.56	0.46
						0.56
<b>2M à 100°C</b>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.31	0.31
	0.09	0.09	0.09	0.09	0.36	0.36
	0.20	0.18	0.18	0.18	0.45	0.45
	0.26	0.31	0.31	0.31	0.50	0.50

	0.45	0.45	0.45	0.36	0.60	0.60
	0.50	0.50	0.50	0.45	0.65	0.65
	0.60	0.60	0.60	0.50		
	0.65			0.60		
<b>4M à 80°C</b>	0.03	0.07	0.07	0.14	0.14	0.14
	0.07	0.14	0.14	0.20	0.20	0.20
	0.14	0.20	0.20	0.28	0.28	0.28
	0.20	0.28	0.28	0.39	0.39	0.39
	0.28	0.39	0.39	0.48	0.48	0.48
	0.39	0.48	0.48	0.52	0.52	0.52
	0.48	0.52	0.52	0.60	0.60	0.60
	0.52	0.60	0.60			
<b>4M à 100°C</b>	0.21	0.07	0.07	0.07	0.07	0.13
	0.28	0.21	0.13	0.13	0.13	0.22
	0.35	0.28	0.28	0.28	0.28	0.48
	0.42	0.48	0.48	0.48	0.48	0.54
	0.48	0.54	0.54	0.54	0.54	
	0.54	0.63	0.63	0.63	0.63	
	0.63					

## Annexe 03

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides de *P. notata* dans le système 01

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
0.5M à 80°C	0.44	0.11	0.11	0.07	0.11	0.11
	0.49	0.18	0.18	0.11	0.18	0.26
	0.54	0.21	0.21	0.18	0.26	0.37
		0.32	0.26	0.26	0.37	0.44
		0.39	0.37	0.37	0.44	0.54
		0.44	0.44	0.44	0.49	
		0.49	0.49	0.54	0.54	
		0.54	0.54			
0.5M à 100°C	0.06	0.13	0.13	0.13	0.06	0.06
	0.09	0.16	0.16	0.16	0.22	0.22
	0.10	0.20	0.20	0.20	0.44	0.44
	0.13	0.31	0.40	0.40	0.50	0.50
	0.16	0.40	0.48	0.48		
	0.20	0.48	0.52	0.52		
	0.24	0.58	0.58	0.58		
	0.26					
	0.31					
	0.34					
	0.40					
	0.48					
	0.52					
	0.58					
2M à 80°C	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
	0.14	0.14	0.11	0.11	0.11	0.11
	0.18	0.18	0.18	0.15	0.15	0.15
	0.21	0.21	0.21	0.37	0.37	0.37



	0.37	0.25	0.25	0.42	0.42	0.42
	0.42	0.37	0.37	0.47	0.47	0.47
	0.47	0.42	0.42	0.53	0.53	0.53
	0.53	0.47	0.47			
		0.53	0.53			
2M à 100°C	0.40	0.12	0.12	0.12		
	0.45	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
	0.56	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
		0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
		0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
4M à 80°C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
	0.25	0.25	0.15	0.15	0.25	0.25
	0.37	0.37	0.25	0.25	0.48	0.48
	0.48	0.48	0.37	0.48	0.53	0.53
	0.53	0.53	0.48	0.53	0.62	0.62
	0.62	0.62	0.53	0.62		
			0.62			
4M à 100°C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04	0.16
	0.29	0.25	0.29	0.29	0.16	0.25
	0.34	0.34	0.46	0.46	0.25	0.46
	0.41	0.41	0.52	0.57	0.46	0.51
	0.46	0.47	0.57	0.67	0.51	0.60
	0.52	0.52	0.67		0.60	
	0.57	0.57				
	0.67	0.67				

## Annexe 04

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides de *P. notata* dans le système 02.

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
0,5M à 80°C	0.48	0.48	0.23	0.13	0.13	0.18
	0.53	0.53	0.37	0.18	0.18	0.23
			0.46	0.23	0.23	0.31
			0.48	0.31	0.31	0.46
			0.53	0.37	0.37	0.48
				0.46	0.46	0.53
				0.48	0.48	
				0.53	0.53	
0,5M à 100°C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
	0.10	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	0.13	0.32	0.42	0.42	0.42	0.42
	0.17	0.42	0.47	0.47	0.47	0.47
	0.21	0.47	0.56	0.56	0.56	0.56
	0.25	0.56				
	0.32					
	0.35					
	0.42					
	0.47					
	0.50					
0.56						
2M à 80°C	0.34	0.34	0.06	0.06	0.06	0.06
	0.38	0.38	0.11	0.11	0.11	0.11
	0.41	0.41	0.16	0.16	0.16	0.16
	0.48	0.48	0.21	0.28	0.28	0.28
	0.53	0.53	0.28	0.35	0.35	0.35
	0.57	0.57	0.32	0.43	0.43	0.43
	0.63	0.63	0.38	0.53	0.53	0.53

			0.43	0.57	0.57	0.57
			0.48	0.63	0.63	0.63
			0.53			
			0.57			
			0.63			
2M à 100°C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.33	0.12
	0.18	0.18	0.18	0.18	0.44	0.30
	0.44	0.44	0.44	0.44	0.48	0.48
	0.49	0.49	0.49	0.49	0.58	0.55
	0.58	0.58	0.58	0.58		0.62
						0.68
4M à 80°C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.02	0.02
	0.12	0.12	0.12	0.12	0.06	0.12
	0.23	0.23	0.23	0.23	0.12	0.23
	0.31	0.31	0.31	0.31	0.23	0.30
	0.38	0.38	0.38	0.38	0.30	0.37
	0.44	0.44	0.44	0.44	0.38	0.52
	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.63
0.63	0.63	0.63	0.63	0.63		
4M à 100°C	0.35	0.30	0.11	0.11	0.13	0.13
	0.44	0.35	0.23	0.23	0.23	0.23
	0.50	0.44	0.30	0.30	0.30	0.30
	0.57	0.50	0.44	0.44	0.35	0.35
		0.57	0.50	0.50	0.48	0.48
			0.57	0.57	0.54	0.54
					0.63	0.63

## Annexe 05

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides d'*U. noctiflora* dans le système 01

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
<b>0,5M à 80°C</b>	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
	0.25	0.25	0.25	0.30	0.30	0.30
	0.30	0.30	0.30	0.36	0.36	0.36
	0.36	0.36	0.36	0.40	0.40	0.40
	0.40	0.40	0.40			0.54
						0.67
						0.74
<b>05M à 100°C</b>	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
<b>2M à 80°C</b>	0.12	0.12	0.07	0.21	0.21	0.28
	0.16	0.16	0.12	0.25	0.25	0.40
	0.21	0.21	0.16	0.28	0.28	0.44
	0.23	0.23	0.21	0.35	0.35	
	0.25	0.25	0.25	0.38	0.38	
	0.28	0.28	0.35	0.42	0.42	
	0.30	0.30	0.40			
	0.35	0.35				
	0.42	0.42				
<b>2M à 100°C</b>	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
<b>4M à 80°C</b>	0.28	0.28	0.28	0.28	0.23	0.28
	0.32	0.32	0.32	0.32	0.28	0.32
	0.50	0.50	0.50	0.42	0.32	0.50
	0.59	0.59	0.59	0.50	0.35	0.59
				0.59	0.42	
				0.50		
					0.59	

<b>4M à 100°C</b>	0.21	0.21	0.21	50	50	50
	0.26	0.26	0.26			
	0.36	0.36	0.36			
	0.43	0.43	0.43			
	0.50	0.5	0.50			
				0.58		

## Annexe 06

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides d'*U. noctiflora* dans le système 02

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
0,5M à 80°C	0.25	0.48	0.12	0.12	0.17	0.48 Sous formet rainée
	0.33		0.16	0.16	0.22	
	0.38		0.48	0.21	0.27	
	0.48			0.25	0.48	
	0.48			0.48		
0,5M à 100°C	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
	0.4	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
2M à 80°C	0.34	0.40	0.23	0.40	0.40	0.52
	0.40	0.52	0.40	0.52	0.52	0.61
	0.52	0.81	0.52	0.61	0.61	0.81
	0.81		0.61	0.81	0.81	
			0.81			
2M à 100°C	0.28	0.28	0.28	0.28	0.43	0.43
	0.32	0.32	0.32	0.32	0.48	0.48
	0.38	0.38	0.38	0.43	0.54	0.54
	0.48	0.48	0.48	0.48		
			0.54			
4M à 80°C	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.53
	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.62
	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.82
	0.65	0.62	0.62	0.62	0.62	
	0.82	0.67	0.67	0.67	0.67	
	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	
4M à 100°C	0.15	0.13	0.31	0.52	0.52	0.52
	0.26	0.18	0.41			
	0.34	0.26	0.49			
	0.45	0.34	0.57			
	0.52	0.45	0.63			
	0.61	0.52				
	0.63					
	0.73					

## Annexe 07

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides d'*A. tenuifolius* dans le système 01.

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
<b>0,5M à 80°C</b>	0.44	0.04	0.06	0.06	0.06	0.06
	0.49	0.06	0.09	0.09	0.09	0.09
		0.09	0.11	0.11	0.11	0.11
		0.11	0.14	0.14	0.14	0.14
		0.14	0.18	0.18	0.18	0.18
		0.18	0.25	0.25	0.25	0.25
		0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
		0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
		0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
		0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
<b>0,5M à 100°C</b>	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
	0.40	0.25	0.25	0.21	0.21	0.21
	0.47	0.35	0.35	0.25	0.25	0.25
		0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
		0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
		0.57	0.57	0.57	0.57	0.57
<b>2M à 80°C</b>	0.04	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
	0.11	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
<b>2M à 100°C</b>	0.06	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
	0.12	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
	0.16	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	0.20	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
	0.38	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
	0.45	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
	0.55					
<b>4M à 80°C</b>	0.16	0.16	0.16	0.06	0.06	0.06
	0.19	0.19	0.19	0.16	0.16	0.16
	0.24	0.24	0.24	0.19	0.19	0.19
	0.28	0.28	0.28	0.24	0.24	0.24
	0.40	0.40	0.40	0.28	0.28	0.28
	0.48	0.48	0.48	0.40	0.40	0.40
	0.52	0.52	0.52	0.48	0.48	0.48
	0.61	0.61	0.61	0.52	0.52	0.52
	0.66	0.66	0.66	0.61	0.61	0.61
			0.66	0.66	0.66	
<b>4M à 100°C</b>	0.06	0.06	0.19	0.19	0.19	0.19
	0.19	0.19	0.29	0.29	0.29	0.29
	0.29	0.29	0.32	0.32	0.32	0.32
	0.32	0.32	0.52	0.52	0.52	0.52
	0.52	0.52	0.58	0.58	0.58	0.58
	0.58	0.58	0.67	0.67	0.67	0.67
	0.67	0.67				

## Annexe 08

R<sub>f</sub> des hydrolysats des polysaccharides d'*A. tenuifolius* dans le système 02.

Temps	30mn	1h	2h	3h	4h	5h
<b>0,5Mà 80°C</b>	0.48	0.48	0.23	0.23	0.48	0.48
			0.36	0.48	0.53	0.53
			0.48	0.53	0.61	0.61
			0.53	0.61		
			0.61			
<b>0,5Mà 100°C</b>	0.44	0.44	0.08	0.08	0.08	0.08
	0.48	0.48	0.26	0.26	0.26	0.26
			0.42	0.42	0.42	0.42
			0.48	0.48	0.48	0.48
			0.57	0.57	0.57	0.57
<b>2M à80°C</b>	0.32	0.11	0.05	0.05	0.11	0.11
	0.38	0.16	0.13	0.13	0.16	0.16
	0.41	0.26	0.16	0.16	0.26	0.26
	0.44	0.32	0.26	0.26	0.32	0.32
	0.57	0.36	0.32	0.32	0.36	0.35
		0.42	0.36	0.36	0.42	0.42
		0.47	0.42	0.42	0.47	0.47
		0.52	0.53	0.53	0.52	0.52
		0.57	0.57	0.57	0.57	0.57
		0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
<b>2Mà100°C</b>	0.12	0.21	0.21	0.25	0.16	0.16
	0.21	0.37	0.37	0.43	0.25	0.25
	0.37	0.53	0.53	0.48	0.43	0.43
	0.53	0.59	0.59	0.59	0.48	0.48
	0.59			0.63	0.59	0.59
				0.63	0.63	
<b>4M à80°C</b>	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53
	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
<b>4Mà100°C</b>	0.13	0.13	0.05	0.05	0.05	0.05
	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30	0.30
	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
	0.47	0.47	0.47	0.46	0.46	0.46
	0.54	0.54	0.54	0.51	0.51	0.51
	0.63	0.63	0.63	0.58	0.58	0.58
	0.67	0.67	0.67	0.63	0.63	0.63



## *Résumés*

# Caractérisation physico-chimique des polysaccharides de quelques plantes spontanées à caractère médicinal récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien): Activité biologique

## Résumé

L'étude porte sur les polysaccharides issus des extraits de différentes parties de quelques plantes spontanées à caractère médicinal, récoltées dans la région de Ghardaïa, située au Sahara septentrional Est algérien. Il s'agit de la partie aérienne d'*Asphodelus tenuifolius* Cavan. (Liliaceae), des bulbes d'*Urginea noctiflora* Batt et Trab. (Liliaceae) et des graines d'*Astragalus armatus* Lam. (Fabaceae) et de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). Après avoir défini les conditions optimales d'hydrolyse à l'acide trifluoroacétique, l'analyse par GC/MS-EI et HPAEC-PAD des monosaccharides, laisse apparaître de polysaccharides de type glucomannane, avec un rapport molaire glucose/mannose 0,80 dans la partie aérienne d'*A. tenuifolius*. Les polysaccharides de bulbes d'*U. noctiflora* renferme 50,2% du glucose, 38,6% du mannose, et 11,2% du galactose. Ceux des graines de *P. notata*, contiennent principalement du xylose (38,1%), de l'acide galacturonique (18,0%), du glucose (12,5%), du rhamnose (10,8%), du galactose (10,6%), et de l'arabinose (9,90%). Il est retrouvé un galactomannane avec un rapport mannose/ glucose de 1,6 dans l'extrait des graines d'*A. armatus*. La diversité structurale remarquable des polysaccharides, permet d'espérer un large spectre de propriétés anti-complément et prébiotique qui pourront être ajustées par hydrolyse acide. Une forte activité anti-complément est remarquée chez les polysaccharides des graines de *P. notata*, exprimée par une concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) de 0,210±0,028mg/ml par rapport à celle notée pour l'héparine (0,376±0,039mg/ml). Des activités moindres exprimées par des CI<sub>50</sub> de 0,590±0,016mg/ml, 0,947±0,008mg/ml et 0,984± 0,21mg/ml, sont observées respectivement pour les polysaccharides de bulbes d'*U. noctiflora*, de la partie aérienne d'*A. tenuifolius* et des graines d'*A. armatus*. L'effet prébiotique des hydrolysats de polysaccharides sur la croissance *in vitro* de *Lactobacillus casei*, se traduit par une croissance remarquable. Il est après 24h de culture, de 0,4 unité pour l'extrait de la partie aérienne d'*A. tenuifolius* et 0,33 unité pour les graines de *P. notata*, par rapport au témoin négatif. Cette action conduit à la diminution du pH (5,39 et 5,44) et à une augmentation de l'acidité titrable (5,76 et 5,67), respectivement pour les hydrolysats d'*A. tenuifolius* et de *P. notata*, ce qui s'explique par une activité métabolique de la souche probiotique.

**Mots clés:** Polysaccharides, plantes spontanées, médicinal, hydrolyse, activité, anti-complement, prébiotique, Sahara.

## Chemical composition and bioactivity of water soluble polysaccharides extracted from some medicinal plants harvested in the region of Ghardaïa (Septentrional Sahara algerian)

### Abstract

The study focuses on water-soluble polysaccharides extracted from different parts of four spontaneous plants used as traditional medicine in Ghardaïa (Septentrional Sahara Algerian). These include; the aerial part of *Asphodelus tenuifolius* Cavan. (Lilliaceae), bulbs of *Urginea noctiflora* Batt and Trab. (Lilliaceae), seeds of *Astragalus armatus* Lam. (Fabaceae) and seeds of *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). Different polysaccharide hydrolysis procedures were carried out including the following variants; three concentrations of trifluoroacetic acid, five durations of hydrolysis and at two temperatures. Structural characterization of resulting monosaccharides using GC/MS-EI and HPAEC-PAD showed that *A. tenuifolius* aerial part polysaccharides are of glucomannan nature and contained a molar ratio of glucose to mannose of 0.80. The monosaccharide composition of polysaccharides from *U. noctiflora* bulbs in weight % was glucose (50.2%), mannose (38.6%), and galactose (11.2%). Whereas the water soluble polysaccharides of *P. notata* seeds consisted mainly of xylose (38,1%) along with galacturonic acid (18,0%), glucose (12,5%) , rhamnose (10,8%), galactose (10,6%), and small amount of arabinose (9,90%), indicating the presence of pectin-like polysaccharides. The analysis also revealed that *A. armatus* seeds contained galactomannan type polysaccharides with molar ratio of galactose to mannose of 1.6. The variation in the chemical structure of polysaccharides detected in the studied plants suggests the possibility of a broad spectrum biological activity. The polysaccharide extracts were investigated *in vitro* for their anticomplement activity. Of these, polysaccharides from *P. notata* showed the highest activity with a 50% hemolysis inhibiting concentration (IC<sub>50</sub>) value of 0.210±0.028 mg/ml compared to that observed for heparin (0.376±0.039 mg/ml). Less activities expressed by IC<sub>50</sub> of 0.590±0.016mg/ml, 0.947±0.008mg/ml and 0.984±0.21mg/ml, were observed for polysaccharides of *U. noctiflora* bulbs, *A. tenuifolius* air part and *A. armatus* seeds, respectively. The prebiotic effect of polysaccharides hydrolysis was evaluated on *in vitro* growth of *Lactobacillus casei*. Polysaccharides hydrolysis from *A. tenuifolius* aerial part and *P. notata* seeds showed higher improvement of growth after 24 hours of culture, about 0.4 unit and 0.33 unit, according to the negative control, combined with the decrease in

pH (5.39 and 5.44) and the increase in titrable acidity (5.76 and 5.67), respectively, resulting an increase in metabolic activity of the probiotic strain.

**Keywords:** Polysaccharides, spontaneous plants, medicinal, characterization, anti-complement, prebiotic, Sahara.

دراسة التركيب الكيميائي والنشاط الحيوي للسكريات المتعددة القابلة للذوبان في الماء التي تم استخلاصها من بعض النباتات الطبية المستعملة بمنطقة غرداية (شمال شرق صحراء الجزائر)

## ملخص

تتركز الدراسة على السكريات المتعددة القابلة للذوبان في الماء، المستخلصة من بعض أجزاء النباتات التلقائية ذات الطابع الطبي التي تم حصادها بمنطقة غرداية (شمال شرق صحراء الجزائر). والتي تشمل الجزء العلوي لنبات الطازية (*Asphodelus tenuifolius Cavan Lilliaceae*) ، درنة بصيص الفار (*Urginea noctiflora Batt. Lilliaceae*) ، بذور القندول (*Astragalus armatus Lam. Fabaceae*) و بذور اللينم (*Plantago notata Lagasca, Plantaginaceae*). الخطوة الأولى من هذه الدراسة تهدف إلى دراسة المكونات الكيميائية للعينات التي تم جمعها، والتي أظهرت وجود مركبات كيميائية مختلفة هامة كمتعددة الفينولات والفلافونويدات. الجزء الثاني يتعلق باستخراج، دراسة التركيب و التحليل النوعي و الكمي للسكريات المتعددة القابلة للذوبان في الماء. بعد تحديد الظروف المثلى للتحلل الحمضي للسكريات المتعددة ، قمنا بتنفيذ استراتيجية التحليل البنوي . أظهر تحليل مستخلصات السكريات المتعددة باستعمال GC / MS- EI و HPAEC - PAD أن الجزء العلوي لنبات الطازية يحتوي على متعدد السكر من نوع جلوكومانان، حيث أن النسبة المولية للجلوكوز إلى المانوز فيه تقدر بـ 0.80. يحتوي متعدد سكر درنة بصيص الفار على الجلوكوز (50.2%)، المانوز (38.6%) ، و الجالاكتوز (11.2%) . في حين أن السكريات المتعددة القابلة للذوبان في الماء المستخلصة من بذور اللينم تتألف أساسا من الزيولوز (38.1%) ، حمض الجالاكتورونيك (18.0%)، الجلوكوز (12.5%)، الجالاكتوز (10.6%)، الرامنوز (10.8%)، و نسبة صغيرة من الأرابينوز (9.90%). وكشف التحليل أيضا أن بذور القندول يحتوي على متعدد السكر من نوع جالاكتومانان مع النسبة المولية للجالاكتوز إلى المانوز المقدر بـ 1.6. بعد ملاحظة تنوع التراكيب الكيميائية للسكريات المتعددة ، أتيح لنا توقع مجموعة واسعة من الأنشطة البيولوجية مثل تثبيط المتمم و البريبايوتكس، التي يمكن تعديلها بواسطة خصائص التحلل الحمضي. تم مقارنة أنشطة تثبيط السكريات المتعددة للمتمم مع نشاط الهيبارين، الذي يستخدم كشاهد إيجابي فأظهرت الدراسة بأن أقوى نشاط مثبت للمتمم يعود للسكريات المتعددة القابلة للذوبان في الماء المستخلصة من بذور اللينم بنسبة تثبيط 50% من المتمم (CI<sub>50</sub>) مقدر بـ 0.210±0.028mg/ml. كما أن السكريات المتعددة للقندول فقد أظهرت أضعف نشاط بتركيز CI<sub>50</sub> يساوي 0.984±0.21mg/ml . بشأن النشاط البريبايوتكس، أظهرت السكريات المفككة من الجزء العلوي لنبات الطازية تحسين نمو بكتيريا الحليب من النوع *Lactobacillus casei* بنسبة 0.4 وحدة بعد 24 ساعة ، و 0.33 وحدة في السكريات المفككة من بذور اللينم ، مقارنة بالشاهد السلبي ، مع انخفاض في درجة pH ( 5.39 و 5.44 ) وزيادة في الحموضة ( 5.67 و 5.76 ) على التوالي ، مما يبين زيادة النشاط الأيضي في سلالة البروبيوتيك.

**الكلمات المفتاحية:** السكريات المتعددة، النباتات التلقائية، الطبية، دراسة التركيب، مثبت للمتمم، البريبايوتكس.

## *Publications*

## Publications internationales

1.- **BOUAL Zakaria**, KEMASSI Abdellah, OULD EL HADJ-KHELIL Aminata, MICHAUD Philippe, and OULD EL HADJ Mohamed Didi, 2012.- Partial Characterization and Hydrolysis Procedure of Water Soluble Polysaccharides Extracted from One saharan Medicinal Plant: *Malva aegyptiaca* L. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, Vol. 2, No. 2:100-103. [www.ijbbb.org](http://www.ijbbb.org)  
<http://www.ijbbb.org/vol2no2.htm>

2.- **BOUAL Zakaria**, KEMASSI Abdellah, HAMID OUDJANA Aicha, MICHAUD Philippe et OULD EL HADJ Mohammed Didi, 2013.- Caracterisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* L. (Malvaceae) : activite prebiotique. Lebanese Science Journal, Vol. 14, N° 2. [www.cnrs.edu.lb/ljsj.html](http://www.cnrs.edu.lb/ljsj.html)

## Publications Nationales

1.- **BOUAL Zakaria**, KEMASSI Abdellah, MICHAUD Philippe et OULD EL HADJ Mohammed Didi, 2011.- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius* Cavan (Liliaceae): effet prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides. *Algerian journal of arid environment*. vol. 1, n° 2, Décembre 2011: 52-60. ISSN 2170-1318. <http://www.ouargla-univ.dz/>

2.- **BOUAL Zakaria**, OULD EL HADJ-KHELIL Aminata, KEMASSI Abdellah, DADDI BOUHOUN Mustapha, 2012.- Etude comparative des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits éthanoliques des graines de deux plantes spontanées à caractère médicinales récoltées dans la région de Ghardaïa. *PhytoChem & BioSub Journal* Vol. 5 (2). [www.posl.webs.com](http://www.posl.webs.com) ISSN 2170-1768.

3.- **BOUAL Zakaria**, KEMASSI Abdellah, HAMID OUDJANA Aicha, MICHAUD Philipe et OULD EL HADJ Mohamed Didi, 2013.- Caractérisation physico-chimique et biochimique des bulbes d'*Urginea noctiflora* (Liliaceae) récoltée dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie): Activités antioxydantes et antibactériennes. *PhytoChem & BioSub Journal* Vol. 7 (2). [www.posl.webs.com](http://www.posl.webs.com) ISSN 2170-1768.



# Partial Characterization and Hydrolysis Procedure of Water Soluble Polysaccharides Extracted from Onesaharian Medicinal Plant: *Malvaegyptiaca* L.

Zakaria Boual, Abdellah Kemassi, Aminata Ould El Hadj Khelil, Philippe Michaud, and Mohammed DidiOuld El Hadj

**Abstract**—*Malvaegyptiaca* L. (Malvaceae), a spontaneous plant used as a traditional medicine in Ghardaïa (Septentrional Sahara Algerian). This paper reports the extraction and partial characterization of water-soluble polysaccharides from *M.aegyptiaca* leaves. These polysaccharides were obtained by elimination of the ethanol extract and sequential extraction in distilled water, followed by precipitation in 75% ethanol. The yield of extract is 1.46% (w/w). The crude water soluble polysaccharide extracts were further characterized and revealed the average values  $17.14 \pm 1.43\%$  proteins and  $78.18 \pm 2.04\%$  carbohydrates, among them  $30.68 \pm 0.42\%$  are uronic acid and  $47.49 \pm 1.62\%$  are neutral monosaccharides. The acid hydrolysis was studied with trifluoroacetic acid (TFA) at two concentrations, with five durations of hydrolysis and at two temperatures. A single hydrolytic step with 4M TFA at 80°C for 4 h is suggested to be more effective in releasing monomers from polysaccharides than other hydrolysis procedures. The identification of monosaccharide composition by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) methods shows 56.86% of galactose, 8.46% of rhamnose, 9.04% of arabinose, 5.05% of mannose and 20.57% of glucuronic acid.

**Index Terms**—*Malvaegyptiaca*, traditional medicine, polysaccharides, HPAEC-PAD.

## I. INTRODUCTION

*Malvaegyptiaca* (Malvaceae) is a spontaneous plant used in traditional medicine prescriptions in Ghardaïa (Septentrional Sahara Algerian) [1]. The macerate of leaves is used in the treatment of dysentery, constipation and fevers. The cataplasm of leaves is also used in treating wounds, sore and skin-eruptions [2]. The Malvaceae family is characterized by the presence of mucilaginous cells that store polysaccharides, allowing the retention of large amounts of water [3]. In recent years, plant producing

polysaccharides have been widely studied in order to understand the relationship between physicochemical characteristics and biological activity. Most of the polysaccharides isolated from medicinal plants, have additional non structural activities, such as pectins which possess immunomodulatory, complement-modulating, anti-HSV (Herpes simplex virus) and anti-inflammatory activities [4]. Furthermore, Polysaccharides are the most abundant organic polymers obtained by biosynthesis, available from different plant and animal sources with variable structures. They have attracted researchers because of their advantages as: (I) renewable character, (II) biodegradation, (III) relatively low cost and (IV) possibility of conversion into various derivatives due to their reactivity with many organic molecules [5]. Owing to the commercial and pharmaceutical usefulness of mucilage, physicochemical characterization of these polysaccharides is of significant importance. In the present study, we report the extraction and partial characterization of water soluble polysaccharides from *M. aegyptiaca* leaves. The monosaccharides generated by acid hydrolysis are isolated by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD).

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Plant Material

The leaves of *M. aegyptiaca* were harvested from Oued Touzouz (region of Ghardaïa) in March 2010, identified, air-dried at ambient temperature for three weeks and stored in cardboard boxes for later use.

### B. Extraction of Water-Soluble Polysaccharides

*M. aegyptiaca* leaves were ground into powder using high speed disintegrator and were pre-extracted with 80% ethanol using a soxhlet apparatus in order to remove some colored materials, oligosaccharides and some other low molecular weight compounds. When no more colored material could be observed in the ethanol extract the procedure was ceased and the organic solvent left in the residue was allowed to dry out [4]. The pretreated dry powder was extracted twice with two volumes of deionized water under constant stirring for 3 h in a 60 °C water bath [4][6]. The mixture was centrifuged (2000g, 20 min), then the supernatant was filtered through gauze and Whatman GF/A glass fiber filter, concentrated at 40 °C in vacuum and dialyzed at cut-off 3500 Da [7]. The extract was precipitated by the addition of ethanol to a final

Manuscript received January 1, 2012; revised February 27, 2012.

Zakaria Boual, Abdellah Kemassi, Aminata Ould El Hadj Khelil, and Mohammed DidiOuld El Hadj are with Laboratoire Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides Université KasdiMerbah-Ouargla, Algeria (e-mail : biozakaria@yahoo.fr ; Tel.: +213 07 95 94 51 44; fax: +213 029 88 7945).

Zakaria Boual and Mohammed DidiOuld El Hadj are with Laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques, Université KasdiMerbah-Ouargla, Algeria

Philippe Michaud is with Laboratoire des Glucides (EPMV) CNRS FRE2779, IUT/GB, UPJV, Avenue des Facultés, Le Bailly, 80025 Amiens Cedex, France

concentration of 75% (v/v) and the precipitates were collected by centrifugation, washed with acetone, dissolved in deionized water and finally lyophilized[4]. Brown crude water-soluble polysaccharides were obtained.

### C. Chemical Composition Analysis

Total neutral sugar content was determined by the reaction with phenol in the presence of sulfuric acid using glucose as a standard [8]. The total uronic acid content was colorimetrically determined by the m-hydroxydiphenyl assay using galacturonic acid as a standard [9]. Proteins in the solution were estimated by the method of binding of Coomassie Brilliant Blue G-250 to protein using bovine serum albumin as a standard [10].

### D. Analysis of Carbohydrate Composition

Composition analyses of polysaccharides have typically been based on hydrolysis procedures using hydrochloric, sulfuric, or trifluoroacetic acid (TFA) at elevated temperatures. More recently TFA has become the acid of choice for most carbohydrate analysis due to its effectiveness at hydrolyzing glycosidic bonds without causing extensive destruction of the resulting monosaccharide components and due to its volatility, which minimizes its interference with subsequent procedures [11]. Different procedures were tested; (a) 2 M TFA at 100°C for 5 h; (b) 4 M TFA at 100°C for 5 h; (c) 4 M TFA at 80°C for 5 h. Finally, the kinetic of liberation and degradation of oligosaccharides chains as a function of the time were performed. The hydrolysate was cooled and evaporated under reduced pressure at 40 °C, washed with methanol and re-dissolved in distilled water. Hydrolysis procedures were estimated by Thin-layer chromatography. The optimum condition of hydrolysis is used in HPAEC-PAD analysis.

#### 1) Thin-layer chromatography (TLC)

The TLC analyses of hydrolysates were performed on silica gel 60G (Merck) plates with butanol:acetic acid:water (2/1/1, v/v) as the developing phase, and the neutral monosaccharide(s) and uronic acids in the hydrolysate were detected by spraying with diphenylamine:aniline:phosphoric acid (5:5:1, v/v), dried and heated at 80 °C for 15 min [12],[13],[14]. R<sub>f</sub> values of different spots were determined by measuring the movement of solvent and movement of solute molecules with a ruler. Movement of solute divided by movement of solvent gives the R<sub>f</sub> value.

#### 2) High performance anion exchange-pulse amperometric detection (HPAE-PAD) chromatography

Monosaccharides resulting from acid hydrolysis are analyzed by HPAEC-PAD method, is currently the most used [15].

#### 3) Sample Preparation

3 mg of polysaccharides was hydrolysed according to procedure (c) for 4 h. The hydrolysate was cooled and evaporated under reduced pressure at 40 °C, washed with methanol and concentrated to dryness. The washing with methanol was repeated several times for removal of the reagent. The hydrolysate was then dissolved in distilled water and fractionated by HPAEC-PAD.

#### 4) Neutral monosaccharides analysis

The neutral monosaccharide compositions of water-

soluble polysaccharides were analyzed by HPAEC after acid hydrolysis. A Dionex system [Dionex Corporation, Sunnyvale (CA), USA] using a CarboPac PA1 (4mm×250mm) and a guard column (3mm×25mm) was used. Detection was carried out by pulsed amperometry with a gold electrode. The hydrolysates (25 mL) were filtered by passing through a 0.45µm filter before injecting into the column with an autosampler. The monosaccharides were eluted isocratically with 16mM NaOH at a flow rate of 1mL.min<sup>-1</sup>. Each carbohydrate concentration was determined after integration of respective areas [Chromleon management system (Dionex)] and their comparison with standard curves obtained with rhamnose, arabinose, mannose, galactose, glucose and fucose (Sigma) [14].

#### 5) Uronic acid analysis

The Uronic acid composition was determined using HPAEC, on a CarboPac PA-1 analytical column (4mm×250 mm). A 100 µL sample was injected and the column was eluted at 1mL.min<sup>-1</sup> with a gradient elution from 600mM Sodium acetate (eluent B) in 160mM Sodium hydroxide (eluent A) using the following program: 0–10 min 100% A and 0% B, 10–40 min 0 to 100% B, 40–45 min 100% B, 45–50 min 100 to 0% B. The eluents were degassed by flushing with helium and pressurized continuously using an eluent degas module (EDM-2, Dionex). The uronic acid contents were quantified by comparing with galacturonic acid and glucuronic acid standards and data were processed using Dionex AI 450 software [17].

## III. RESULTS AND DISCUSSIONS

### A. Chemical Composition

TABLE I: CHEMICAL COMPOSITION OF CRUDE WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES FROM THE DRIED LEAVES OF *M. AEGYPTIACA*

Yield wt. %	Protein wt. %	Carbohydrate wt. %		
		Total	Neutral	Uronic acid
1.46	17.14 ± 1.43	78.18 ± 2.04	47.49 ± 1.62	30.68 ± 0.42

Yield, proteins, neutral monosaccharide and Uronic acid content, of crude water-soluble polysaccharides from the dried leaves of *M. aegyptiaca* are given in Table 1. The crude water-soluble polysaccharides formed a light brown powder without starch, as confirmed by a negative reaction with iodine, similar to that reported by ATKHAMOVA et al. in six species of Malvaceae family [18]. The yield of water-soluble polysaccharides was 1.46%, based on dried leaves. It is slightly less than that reported in *Malvavritana* (Malvaceae) by ATKHAMOVA et al. of 2% [18]. Chemical analysis revealed that crude water-soluble polysaccharides as a heterogeneous mixture of polysaccharides consisted 47.49 ± 1.62% of neutral monosaccharides and 30.68 ± 0.42% of uronic acids such 78.18 ± 0.94% of total carbohydrates, as well as substantial amount of proteins (17.14 ± 1.43%), were greater than that reported by ATKHAMOVA et al., who found in *Malvavritana* 27.4% of uronic acid and 25% of neutral monosaccharides [18].

### B. Acid hydrolysis

The number of spots in TLC Chromatogram and their Rf value were used as a criterion for the selection of the optimal hydrolysis conditions. Hydrolysis with 4 M TFA for 5 h at 100°C shows an effective depolymerization compared to that of 2 M TFA for 5 h at 100°C. The chromatogram of this end (Fig. 1) showed one spot (Rf = 0.24) with training compared to 6 or 7 wide spots with variable Rf value from 0.23 to 0.66 for the hydrolysis by TFA 4 M (Fig. 2). While, hydrolysis by TFA 4 M with low temperature 80°C for 5 h (Fig. 3) shows a significant hydrolysis and much less monosaccharides was degraded appeared in TLC plates by thin spots compared to wide spots in TFA 4 M during 5 h at 100°C. The kinetic of hydrolysis shows that 4 h of treatment with 4 M TFA at 80°C is satisfactorily to the hydrolysis procedure for describing and defining the optimal conditions for the maximal breakdown of polysaccharides to monosaccharides and minimizing the destruction of these monosaccharides due to the thermal and chemical reactions (Fig. 4).

### C. Monosaccharide composition

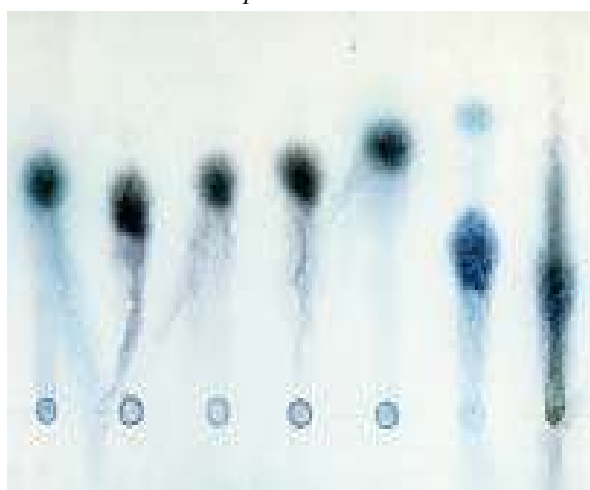


Fig. 1. Chromatogram of WSP of *M. aegyptiacaleaves* hydrolyzed by TFA 2 M for 5 h at 100°C.

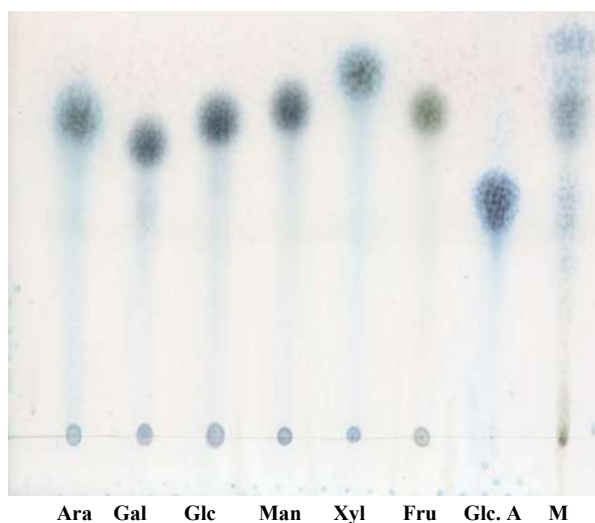


Fig. 2. Chromatogram of WSP of *M. aegyptiacaleaves* hydrolyzed by TFA 4 M for 5 h at 100°C.

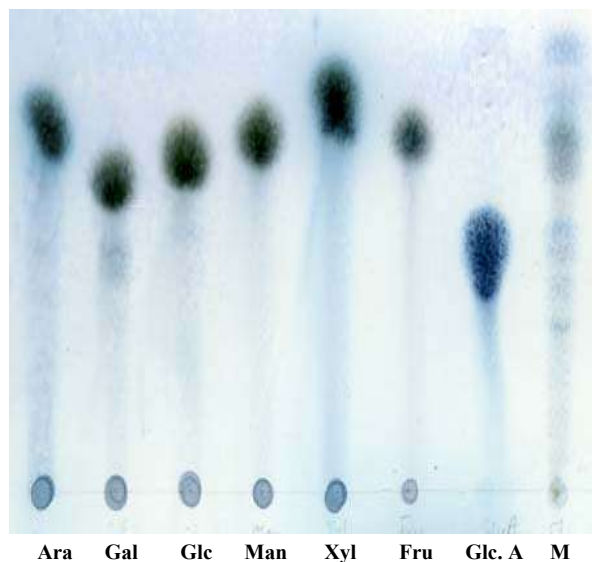


Fig. 3. Chromatogram of WSP of *M. aegyptiacaleaves* hydrolyzed by TFA 4 M for 5 h at 80°C

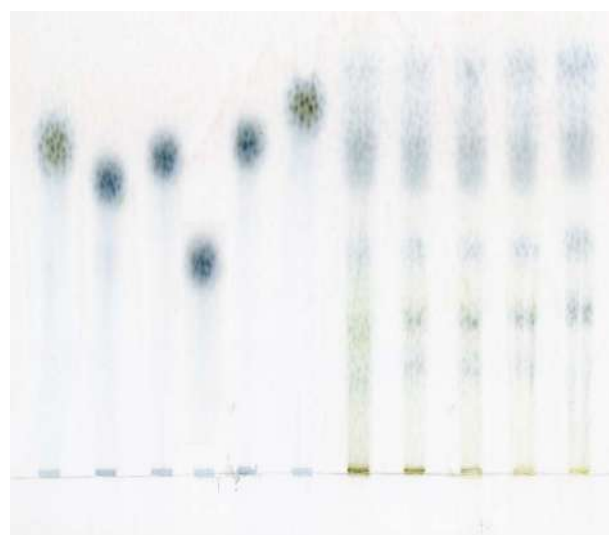


Fig. 4. Chromatogram of kinetic hydrolysis of WSP of *M. aegyptiacaleaves* hydrolyzed (TFA 4 M/80°C)

The result of HPAEC profile of acid hydrolysis of water-soluble polysaccharides from the dried leaves of *M. aegyptiaca* is shown in Fig. 5. Significant differences of monosaccharide composition were observed, compared to results reported in other species of Malvaceae. It consisted of galactose, rhamnose, arabinose, mannose and glucuronic acid with the weight percentage of 56.86%, 8.46%, 9.04%, 5.05% and 20.57%, respectively. The monosaccharide contents are summarized in Fig. 6. TOMODA *et al.* reported that polysaccharides of *M. sylvestris* leaves were composed of 22.2% L-galactose, 40.2% L-rhamnose, 16.0% D-galacturonic acid and 16% D-glucuronic acid [19]. While ATKHAMOVA *et al.* mentioned that the polysaccharides of *M. mauritanaleaves* composed of 10% rhamnose, 5% arabinose, 7.5% galactose, 1.5% mannose, 1% glucose and 27% uronic acid [11]. These last values are considerably different from the values observed in our study. According to ATKHAMOVA *et al.*, Polysaccharides of Malvaceae

consist of a rhamnogalacturonan with uronic acids and galactose ramifications [18]. The monosaccharide content in this study are very similar to that reported in gum arabic (*Acacia senegal*) by WILLIAMS and PHILLIPS, whose pointed out 44% of galactose, 13% of rhamnose, 27% of arabinose and 15% of glucuronic acid [20].

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pr. Philippe MICHAUD from Laboratory of Chemical and Biochemical Engineering at Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand for the HPAEC analysis. Acknowledgements also go to Laboratoire Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides for technical support.

## REFERENCES

- [1] P. Ozenda. Flore du sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, pp.617, 1983.
- [2] A. Battandier. Le droguier d'un mozabite. Imprimés de bibliothèque nationale de la république française, Paris, pp. 3-12, 1882.
- [3] M. L. Matthews and P. K. Endress, "Floral structure and systematics in four orders of rosids, including a broad survey of floral mucilage cells," *Pl. Syst. Evol.*, 260: 199-221, 2006.
- [4] Y. Wu, S. W. Cui, J. Tang, Q. Wang, and X. Gu, "Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds," *Carbohydrate polymers*, vol. 70, pp. 437-443, 2007.
- [5] M. Renaud, M. N. Belgacem and Rinaudo, "Rheological behaviour of polysaccharide aqueous solutions," *Polymer*, vol. 46, pp.12348-12358, 2005.
- [6] T. R. Cipriani, C. G. Mellinger, L. M. De Souza, C. H. Baggio, C.S. Freitas, M. A. Marques, P. J. Gorin, G. L. Sasaki, and M. Iacomini, "Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*," *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, pp. 361-363, 2009.
- [7] C. S. Nergard, D. Diallo, T. E. Michaelsen, K. E. Malterud, H. Kiyohara, T. Matsumoto, H. Yamada, and B. S. Paulsen. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 91: 141-152.
- [8] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Analytical Chemistry*, vol. 28, pp. 350-356, 1956.
- [9] N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hansen, "New method for quantitative determination of uronic acids," *Analytical biochemistry*, vol. 54, pp. 484-489, 1973.
- [10] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol.72, pp. 248-252, 1976.
- [11] C. C. Yu IP, V. Manam, R. Hepler and J. P. Hennessey, "Carbohydrate Composition Analysis of Bacterial Polysaccharides: Optimized Acid Hydrolysis Conditions for HPAEC-PAD Analysis," *Analytical Biochemistry*, vol. 201, pp. 343-349, 1992.
- [12] Q. Wang and Y. Fang, "Analysis of sugars in traditional Chinese drugs," *Journal of Chromatography B*, vol. 812, pp. 309-324, 2004.
- [13] G. Ruiz, "Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges," Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp. 36-38, 2005.
- [14] B. S. Paulsen, E. S. Olafsdottir, and K. Ingolfsson, "Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens," *Journal of Chromatography A*, vol. 967, pp.163-171, 2002.
- [15] L. Johansson, L. Virkki, H. Anttila, H. Esselstrom, P. Tuomainen, T. Sontag-Strohm. Hydrolysis of  $\beta$ -glucan. 2006, *Food Chemistry*, 97: 71-79.
- [16] A. B. Samuelsen, E. H. Cohen, B. S. Paulsen, L. P. Brull, J. E. Thomas-Oates, Structural studies of a heteroxylan from *Plantago major* L. seeds by partial hydrolysis, HPAEC-PAD, methylation and GC-MS, ESMS and ESMS: MS," *Carbohydrate Research*, vol. 315, pp. 312-318, 1999.
- [17] L. Kamerling, G. L. Boons, Y. C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi and A. Voragen, "Comprehensive glycoscience," *Ed. Elsevier*, 02, Paris: 654-681, 2007.
- [18] S. K. Atkhamova, D. A. Rakhimov, E. L. Kristallovich, A. K. Karimdzhanov, and A. I. Ismailov, "Plant polysaccharides. VI. Polysaccharides of representatives of the malvaceae family," *Chemistry of natural compounds*, vol. 33, pp. 590- 593, 1997.
- [19] M. Tomoda, M. Kanari, R. Gonda, and N. Shimizu, "A Reticuloendothelial system-activating glycan from the seeds of *Malva verticillata*," *Phytochemistry*, vol. 28, pp. 2609-261, 1989.
- [20] P. A. Williams and G. O. Phillips, "Gum arabic. Handbook of hydrocolloids," *CRC Press*, pp. 155-168, 2000.

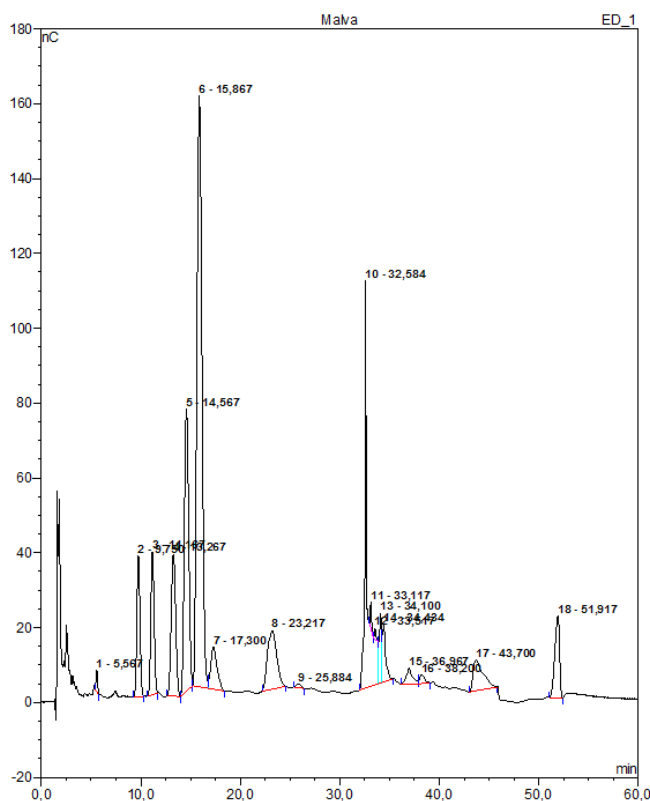


Fig. 5. HPAEC profiles of monosaccharides released from WSP of *M. aegyptiaca* leaves by acid hydrolysis.

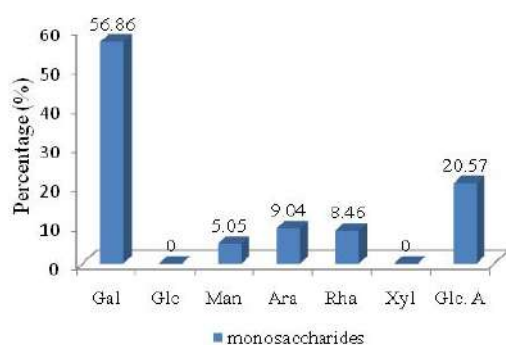


Fig. 6. Percentage of monosaccharides composition from the acid hydrolysate of WSP of *M. aegyptiaca* leaves using HPAEC-PAD.

## IV. CONCLUSION

Water-soluble polysaccharides of *Malva aegyptiaca* leaves can be effectively extracted by distilled water. The extracted mucilage contains high levels of carbohydrates (78.18%). The use of 4M TFA at 80°C for 4 h is the reagent of choice to liberate monosaccharides from polysaccharides, effectively and least destructively. The polysaccharides was comprised mainly of galactose (56%), glucuronic acid (20%) and contained a little amount of rhamnose, arabinose, and mannose.

## CARACTÉRISATION PARTIELLE DES POLYSACCHARIDES HYDROSOLUBLES DES FEUILLES DE *MALVA PARVIFLORA* L. (MALVACEAE): ACTIVITÉ PRÉBIOTIQUE

Zakaria Boual<sup>1</sup>, Abdellah Kemassi<sup>1</sup>, Aicha Hamid Oudjana<sup>1</sup>, Philippe Michaud<sup>2</sup>  
et Ould El Hadj Mohammed Didi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Université Kasdi Merbah-Ouargla, Laboratoire Protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides, 30000 Ouargla, Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire des Glucides (EPMV) CNRS FRE2779, IUT/GB, UPJV, avenue des Facultés Le Bailly, 80025 Amiens Cedex, France

<sup>3</sup>Université Kasdi Merbah-Ouargla, Laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques, 30000 Ouargla, Algérie  
biozakaria@yahoo.fr

(Received 21 March 2011 - Accepted 12 March 2012)

### RÉSUMÉ

*Malva parviflora* L. (Malvaceae), plante spontanée à caractère médicinal pousse dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien). Les feuilles séchées sont traitées à l'éthanol à 75%. Après filtration, le résidu séché à température ordinaire est macéré à l'eau distillée. Des polysaccharides hydrosolubles des feuilles sont obtenus par macération à l'eau distillée. L'addition à cet extrait d'éthanol à 75% précipite les polysaccharides. Le rendement massique est de 1,46%. L'étude de l'extrait aqueux après lyophilisation a donné les valeurs moyennes suivantes : cendres totales (15±2,64%), protéines totales (17,14 ± 1,43%) et oses totaux (68,18±0,94%). Parmi ces derniers, 55 ± 0,62% sont des oses neutres et 44,96 ± 0,42% sont des oses acides. L'hydrolyse des polysaccharides donne le meilleur résultat quand elle est effectuée en milieu trifluoroacétique (4 M) durant 5 heures à 80°C. La chromatographie haute performance sur échangeurs d'anions des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *Malva parviflora* indique la présence de galactose (56,86%), d'acide glucuronique (20,57%), d'arabinose (9,04%), de rhamnose (8,46%) et de mannose (5,05%). Les oligosaccharides provenant de l'hydrolyse partielle des polysaccharides hydrosolubles (concentration de 0,333 mg/mL) stimulent de manière significative pour 0,1 DO après 24 heures la croissance de *Bifidobacterium longum*. Ainsi, l'effet prébiotique de ces oligosaccharides sur cette souche est notable.

**Mots-clés:** polysaccharides, plante spontanée, hydrolyse, oligosaccharides, effet prébiotique

### ABSTRACT

*Malva parviflora* L. (Malvaceae), a spontaneous plant used in traditional medicine is found in Ghardaïa (Septentrional East Algerian Sahara). This paper reports on the extraction and partial characterization of water-soluble polysaccharides from *M. parviflora*

leaves. These polysaccharides were obtained by elimination of the ethanol extract and sequential extraction in distilled water, followed by precipitation in 75% ethanol. The yield of extract is of 1.46%. The crude water-soluble polysaccharide extract was further characterized and revealed the average values:  $15 \pm 2,64\%$  total ashes,  $17,14 \pm 1,43\%$  proteins and  $68,18 \pm 0,94\%$  carbohydrates, among them  $44,96 \pm 0,42\%$  are acidic monosaccharides and the rest  $55 \pm 0,62\%$  are neutral monosaccharides. The considered optimum conditions of hydrolysis by trifluoroacetic acid were: 4 M during 5 hours at 80°C. Anion exchange high performance chromatography of hydrosoluble polysaccharides of Malva leaves indicates the presence of galactose (56.86%), glucuronic acid (20.57%), arabinose (9.04%), rhamnose (8.46%) and mannose (5.05%). The oligosaccharides resulting from the partial hydrolysis of the hydrosoluble polysaccharides stimulate significantly (concentration of 0,333 mg/mL) for 0,1 DO after 24 hours, the growth of *Bifidobacterium longum*. Their prebiotic effect is notable.

**Keywords:** polysaccharides, spontaneous plant, hydrolysis, oligosaccharides, prebiotic effect

## INTRODUCTION

Les poly- et oligosaccharides représentent de véritables auxiliaires indispensables au bon fonctionnement de la vie quotidienne. Un intérêt grandissant concerne leurs applications comme activateurs biologiques. Les oligosaccharides sont de véritables modulateurs biologiques qui participent à de nombreux phénomènes de signalisation dans l'organisme. Ainsi, les oligosaccharides provenant de la dégradation des polysaccharides des plantes (xyloglucane et pectine) ou de champignons ( $\beta$ -glucane et chitine) sont largement décrits comme des régulateurs biologiques actifs, sur des mécanismes tels que la croissance, le développement cellulaire, la symbiose et les réactions de défense. Lors de l'agression d'une plante par un phytopathogène, différents signaux éliciteurs sont émis. Aux premiers stades, les oligogalacturonates issus de la dégradation de la paroi pectocellulosique, vont déclencher une résistance systémique acquise chez le végétal (Aldington & Fry, 1993). Au regard d'activités d'élicitation des réactions de défense des plantes et des algues *via* des oligosaccharides, leurs utilisations comme agents biopesticides et phytosanitaires ont été envisagées dans l'agro-industrie. Ainsi, la production de pénicilline à partir de champignons filamenteux comme *Penicillium chrysogenum* est largement optimisée par des oligo-mannanes et des oligo-alginates issus de *Laminaria hyperborea* (Liu *et al.*, 2001). Ainsi, les oligo-glycosaminoglycanes issues des hyaluronanes sont impliqués dans une grande variété de processus biologiques notamment comme agents cofacteurs de croissance cellulaire, de production de cytokines et de chemokines (Liu *et al.*, 2001). Un rôle dans la régulation de la coagulation sanguine leur a aussi été attribué (Pineo & Hull, 1997; Ghatak *et al.*, 2002). D'autres formes de glucuronanes acétylées ou modifiées chimiquement avec des sulfates présentent des activités de régénération tissulaire chez le rat (Petit *et al.*, 2004). Ces biomolécules présentent des potentiels de régulation biologique sophistiquée, il n'en reste pas moins que de nombreuses applications restent encore peu exploitées du fait d'un manque de stratégies de production de ces composés. Il est en effet difficile d'obtenir quantitativement des oligosaccharides par extraction directe à partir de substances naturelles. Au cours de ces dernières décennies, les voies de dépolymérisation des polysaccharides ont été les plus décrites pour générer des familles oligosaccharidiques originales et variées. Dans ce contexte, et dans le cadre de projet de valorisation de la biodiversité de la flore spontanée du Sahara Septentrional Est algérien, le présent travail consiste à extraire des constituants polysaccharidiques, et bien entendu non décrits à ce jour, de quelques plantes spontanées à

caractère médicinal de la région de Ghardaïa de les caractériser chimiquement et d'optimiser un processus de dépolymérisation et leur bioconversion en oligosaccharides. Les différentes fractions d'oligomères obtenues, ont enfin été testées quant à leur aptitude à répondre aux activités biologiques à savoir l'effet prébiotique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

Les feuilles de *M. parviflora*, sont récoltées d'Oued Touzouz (région de Ghardaïa) en Mars 2008. Les feuilles sont séchées à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante durant trois semaines (Diallo *et al.*, 2004). Les feuilles ainsi séchées sont conservées à température ambiante (15 à 20 °C) dans des boîtes dans un milieu sec à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse.

### Extraction des polysaccharides

Les feuilles séchées sont écrasées et prétraitées par de l'éthanol 75% pendant 5 heures (Diallo *et al.*, 2004), à température ambiante et sous agitation douce; puis filtrées à travers un tamis en papier Whatmann N°1, afin d'éliminer les composés solubles dans l'éthanol, tels que les polyphénols, les oses simples et les acides aminés (Wu *et al.*, 2007). Le résidu des feuilles prétraitées, est séché une seconde fois à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à la température ambiante pendant 48 heures (Diallo *et al.*, 2004). Les feuilles ainsi séchées sont macérées dans 2 volumes d'eau distillée froide, pendant 24 heures à la température ambiante et sous agitation douce. Le mélange est filtré à travers un tamis de porosité 100 µm. Le filtrat est concentré à 60°C à 72 mbar jusqu'à l'obtention du 1/3 du volume initial, dans un évaporateur rotatif (Diallo *et al.*, 2004). Les polysaccharides du concentrat sont précipités à l'aide de 3 volumes éthanol à 75% pendant 24 heures à une température de 4°C. Après centrifugation à 3560 g pendant 10 mn (Diallo *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2007), le culot est récupéré puis lavé 3 fois à l'éthanol à 75%, avant d'être séché par lyophilisation (Ebringerova *et al.*, 2003). Le lyophilisat obtenu représente l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles, pour l'étude de la composition qualitative et quantitative des polysaccharides bruts.

### Composition de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles

Les cendres totales sont déterminées par incinération de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles lyophilisés dans un four à moufle électrique de type Heraeus 6072 à 600°C (Audigie *et al.*, 1984). La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Bradford. La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie (Autran, 1991). Le dosage des oses constitutifs des polysaccharides repose sur la réaction des dérivés sulfuriques obtenus par action à chaud, d'un acide concentré comme l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pour divers composés aromatiques, tels que le phénol pour le dosage des oses neutres (Monsigny *et al.*, 1988), et le méta-hydroxydiphényle pour le dosage des acides uroniques (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973). La concentration en oses neutres est obtenue par référence à une gamme étalon d'arabinose et celle des oses acides avec une gamme étalon d'acide glucuronique (Monsigny *et al.*, 1988).

### **Caractérisation qualitative des résidus glycosidiques**

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse (Ruiz, 2005).

### **Optimisation de l'hydrolyse des liaisons glycosidiques**

Le suivi cinétique d'une hydrolyse est une étape préliminaire indispensable pour définir les conditions optimales de la libération des oses simples et d'oligosaccharides. Les modalités pratiques de la mise en œuvre de l'hydrolyse sont définies en termes de concentration en acide trifluoroacétique 2 M et 4 M sur une période de 5 heures à 100°C d'une part. D'autre part, en fonction de la température à 80 °C et 100 °C tout en gardant la concentration en acide trifluoroacétique fixe à 4 M durant 5 heures. L'évolution du profil est suivie par chromatographie sur couche mince.

### **Chromatographie sur couche mince des résidus glycosidiques**

Pour la présente étude, il sera utilisé différents étalons oses que peuvent renfermer les polysaccharides. Il s'agit du galactose, de l'arabinose, du glucose, de la xylose, du mannose, du fructose et de l'acide glucuronique (Doat, 1974). Les plaques chromatographiques utilisées sont des plaques en gel de silice type Silica gel 60 F 254 de 0.25 mm d'épaisseur (Wang & Fang, 2004). La phase mobile utilisée: Butanol- Acide acétique-Eau, dans les proportions de 2-1-1 (Ruiz, 2005). Le réactif de Nigrum est utilisé comme révélateur des spots (Paulsen *et al.*, 2002).

### **Caractérisation quantitative des résidus glycosidiques par HPAEC-PAD**

La chromatographie à haute performance sur échangeurs d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) permet d'identifier les oses par leur temps de rétention spécifique et de les quantifier après intégration du signal (Chromeleon management system Dionex) par comparaison avec les monosaccharides de référence. Le lyophilisat (3 mg, 0.6% m/v) est placé dans des tubes hermétiques pour être hydrolysé à l'acide trifluoroacétique 4 M pendant 5 heures à 80°C dans un bain Marie à sec thermostaté. Il est ensuite lyophilisé et remis en solution dans 1 ml d'eau distillée. La colonne utilisée est de type CarboPac PA 1 avec un débit d'élution de 1 ml.mn<sup>-1</sup> à l'aide d'un système isocratique d'une solution de NaOH 16 mM (éluant A) pendant 10mn, suivie d'un gradient d'acétate de sodium 600 mM (éluant B) en 4 étapes: 0-10mn, 100% de A ; puis de 10 à 40mn, un gradient linéaire de 0% à 100% de B ; puis de 40 à 45 mn à 100% de B ; et enfin de 45 à 60 mn de 100 à 0% de B (Kamerling *et al.*, 2007). Après détection, les différents oses sont identifiés par leur temps de rétention spécifique et quantifiés après intégration du signal hroomeleon management system ionex par comparaison avec des courbes étalons établies avec les monosaccharides de référence (Sigma).

### **Effet prébiotique d'hydrolysats partiel des polysaccharides sur *Bifidobacterium longum***

Toute substance non digestible qui induit un effet physiologique bénéfique à l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le côlon comme *Lactobacillus* spp et *Bifidobacterium* spp possède un effet prébiotique. Parmi ces substances, on trouve certains



oligosaccharides et polysaccharides (Rousseau, 2004). Les oligosaccharides issus de la dégradation de polysaccharides naturels comme les fructooligosaccharides, les galactooligosaccharides, et les arabinogalactooligosaccharides ont été étudiés pour leur action prébiotique (Delattre, 2005). Face à ce constat, tester l'activité des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des 3 extraits polysaccharidiques s'impose.

### Hydrolyse partielle des polysaccharides

10 mg de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles lyophilisé est hydrolysé par 2 ml d'acide trifluoroacétique 2 M, à 80°C pendant 3 heures, dans des tubes fermés. Après refroidissement, l'hydrolysate est centrifugé à 2000 g pendant 5 mn. Le surnageant est récupéré. L'acide est évaporé dans un dessiccateur sous vide (Genestie, 2006).

### Matériel biologique

L'activité est testée sur *Bifidobacterium longum*, isolé à partir de muqueuses intestinales humaines (adulte). *Bifidobacterium longum* est cultivé sur milieu Trypticase-Soja Bouillon (TSB) sans glucose. Il est constitué de 17 g.l<sup>-1</sup> peptone tryptique de caséine, 3 g.l<sup>-1</sup> peptone papainique de soja, 5 g.l<sup>-1</sup> de NaCl et de 2,5 g.l<sup>-1</sup> de phosphate dipotassique. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 mn. Le pH final est de 7,3 (Marchal *et al.*, 1987).

### Mesure de l'activité biologique

L'activité prébiotique est définie comme les concentrations stimulant, après 24 heures de contact à 37 °C, une croissance bactérienne, mesurée par absorbance à la longueur d'onde de 620 nm, supérieure de 0,1DO par rapport au témoin négatif (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) (Genestie, 2006). On distribue dans un premier temps, dans une série d'écouvillons stériles sur un volume de 1 ml de milieu de culture, des concentrations décroissantes de l'hydrolysate, en régression de 1/2, l'écouvillon représentant l'étalon est constitué seulement de 1 ml de milieu de culture. Puis on ajoute dans chaque écouvillon 1 ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10<sup>6</sup> bactéries.ml<sup>-1</sup> (Berche *et al.*, 1988). Après 24 heures de culture à 37°C, les mesures des absorbances à 620 nm sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre de type Clinical Chemistry System RA-50 contre une référence constituée de milieu de culture stérile.

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

### Caractérisations de l'extrait brut de polysaccharides

Le rendement de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora* par rapport à la matière sèche est de 1,46%. Atkhamova *et al.* (1997), rapportent un rendement supérieur de *M. mavritana* (Malvaceae), soit 2%. Toutefois, les résultats des analyses physico-chimiques de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora*, montrent des valeurs moyennes de 15 ± 2,64% de cendres totales, 17,14 ± 1,43% de protéines totales et 68,18 ± 0,94% d'oses totaux. Parmi les oses, 55 ± 0,62% sont des oses neutres et 44,96 ± 0,42% sont des oses acides (Tab. 1). Il est trouvé 52,2% d'oses totaux dans l'extrait polysaccharidique des feuilles de *M. mavritana* (Atkhamova *et al.* 1997). Le rapport des pourcentages [oses acides] / [oses neutres] pour l'extrait brut de

polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora* est de 0,81, très proche de ceux de *M. mavritana*, soit 0,91.

TABLEAU 1

## Composition de l'Extrait Brut de Polysaccharides

Teneur en oses (%)			Protéines (%)	Cendres (%)
totales	acides	Neutres		
68,18±0,94	44,96±0,42 <sup>a</sup>	55±0,62 <sup>a</sup>	17,14 ± 1,43	15±2,64

a : (%) des oses acides et des oses neutres sont exprimés par rapport aux oses totaux

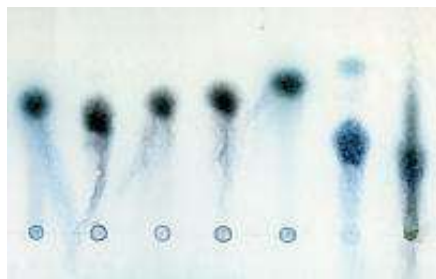
## Optimisation de l'hydrolyse des liaisons glycosidiques

Au vu des Figures 1 et 2, les résultats montrent une variation d'hydrolyse des polysaccharides. L'hydrolyse à 4M montre une dépolymérisation notable par rapport à celle de 2M. Le profil chromatographique de l'hydrolysate de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles (Fig. 1), montre une bande de facteur de rétention ( $R_f$ ) de 0,24 avec des traînées au parcourt de tache, par rapport à 6 ou 7 bandes de  $R_f$  variable de 0,23 à 0,66 pour l'hydrolyse à 4M (Fig. 2). En raison de la grande labilité des polysaccharides de l'extrait et le risque d'une altération des oses simples libérés à 4M et à 100°C, il est suivi la cinétique de leur hydrolyse dans des conditions plus douces, en utilisant de l'acide trifluoroacétique à 4 M mais à 80°C durant 5 heures. L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique dans des conditions opératoires douces entraîne une dépolymérisation notable et une bonne résolution des spots par rapport à celle de 4 M à 100°C. La Figure 3 laisse apparaître 8 bandes bien distinctes par rapport à 7 bandes dans la Figure 2 où 4 bandes ont des  $R_f$  très proches et intercalées par des traînées (0.36, 0.41) et (0.52, 0.56). Ceci semble correspondre à une altération des oses. Donc un abaissement de la température d'hydrolyse de 100°C à 80°C, semble préserver la structure des oses. L'emploi d'une solution d'acide trifluoroacétique 4M, conduit à une hydrolyse significative après 60 mn de réaction à 80°C, avec apparition de 8 taches (Fig. 4). La concentration de coloration des taches de  $R_f$  0.12 et 0.17 entre 2 et 3 heures semble montrer qu'une augmentation du temps de réaction s'accompagne d'une libération accrue d'entités oligosaccharidiques. La disparition des taches de  $R_f$  0.12 entre 4 et 5 heures, et le renforcement de l'intensité des autres taches semblent indiquer une libération des oses simples; comme l'acide glucuronique, de  $R_f$  0.23, selon Kamerling *et al.* (2007), les liaisons uronosidyles sont extrêmement stables.

## Détermination de la composition en oses constitutifs

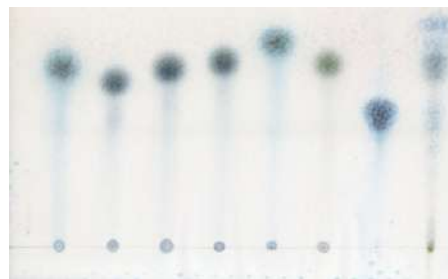
La Figure 5 représente le profil d'HPAEC-PAD de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora*. Il apparaît que l'extrait est constitué principalement de galactose (56,86%), de rhamnose (8,46%), d'arabinose (9,04%), de mannose (5,05%), et d'acide glucuronique (20,57%) (Fig. 6). Les pourcentages des oses constitutifs principaux par rapport au pourcentage de mannose (8,46% sont : Gal/A Glc. /Ara/Rha est 6,72 /2,43 /1,06 /1. Tomoda *et al.* (1989), rapportent comme pourcentage d'oses simples de l'extrait de polysaccharides de feuilles de *M. sylvestris* (Malvaceae), 40,2% de rhamnose, 22,2% de galactose, 16,0% d'acide galacturonique et 16,0% d'acide glucuronique. De même, en plus du glucose dans l'étude d'Atkhamova *et al.* (1997) sur les

polysaccharides hydrosolubles d'extrait des feuilles de *M. mavritana*, avec 10% de rhamnose, 5% d'arabinose, 7,5% de galactose, 1,5% de mannose, 1% de glucose et 27% d'acide uronique. Les polysaccharides des Malvaceae présentent une chaîne Rhamnogalacturonique et des ramifications par des acides uroniques et du galactose (Paulsen *et al.*, 2002). L'analyse des pourcentages des oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora*, montre des valeurs très proches de celles de la gomme arabique soit 32% de galactose, 17-34% d'arabinose, 19% d'acide glucuronique et 11% de rhamnose (Al Assaf *et al.*, 2007).



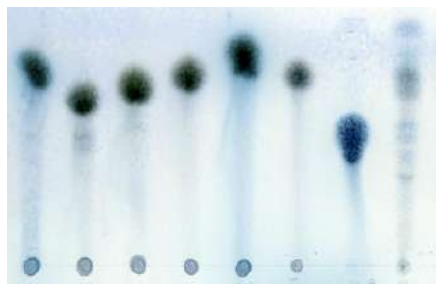
Ara Gal Glc Man Xyl A Glc. M

**Figure 1. Chromatogramme d'hydrolysats d'extrait de polysaccharides hydrosolubles (TFA, 2M, 5 h, 100°C, M: *M. parviflora*).**



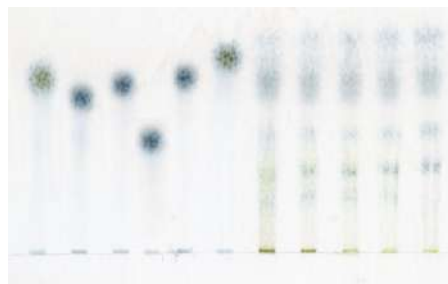
Ara Gal Glc Man Xyl Fru . A Glc M

**Figure 2. Chromatogramme d'hydrolysats d'extrait de polysaccharides hydrosolubles (TFA, 4M, 5 h, 100°C, M: *M. parviflora*).**



Ara Gal Glc Man Xyl Fru A Glc. M

**Figure 3. Chromatogramme d'hydrolysats d'extrait de polysaccharides hydrosolubles, (TFA, 4M, 5 h, 80°C, M: *M. parviflora*).**



Ara Gal Glc AGlc.Man Xyl 1h 2h 3h 4h 5h

**Figure 4. Suivi par CCM de l'hydrolyse d'extrait de polysaccharides par TFA 4 M à 80°C en fonction du temps.**

### Effet prébiotique

L'hydrolysats partiel de polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *Malva*

*parviflora* engendre une amélioration de la croissance de *B. longum* comparativement aux témoins négatifs (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) (Fig. 7). L'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration d'hydrolysats montre une croissance fluctuante, pour les faibles concentrations et n'est effective qu'à partir de 0,166 mg/mL. La différence d'absorbance des milieux de culture additionnés d'oligosaccharides et l'absorbance de milieu de culture étalon dépasse le 0,1 DO. Ils sont donc considérés à effet prébiotique selon Genestie (2006). Les fluctuations à des faibles concentrations de la multiplication dans les milieux de culture contenant des hydrolysats partiels de polysaccharides révèlent les perturbations métaboliques consécutives au changement de source carbonée (Lambin & German, 1969). L'augmentation de la concentration bactérienne pour l'hydrolysats partiels de polysaccharides semble due à l'effet des oligosaccharides, ce qui reflète leur fermentation (Delattre, 2005). Genestie (2006) attribue un caractère prébiotique à la préparation oligosaccharidique testée dès lors que celle-ci engendre un accroissement de 0,1 DO après 24 heures de culture, comparativement aux valeurs mesurées sur témoin négatif (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) pour certaines bactéries intestinales. Cela est remarqué seulement à 0,333 mg.ml<sup>-1</sup>.

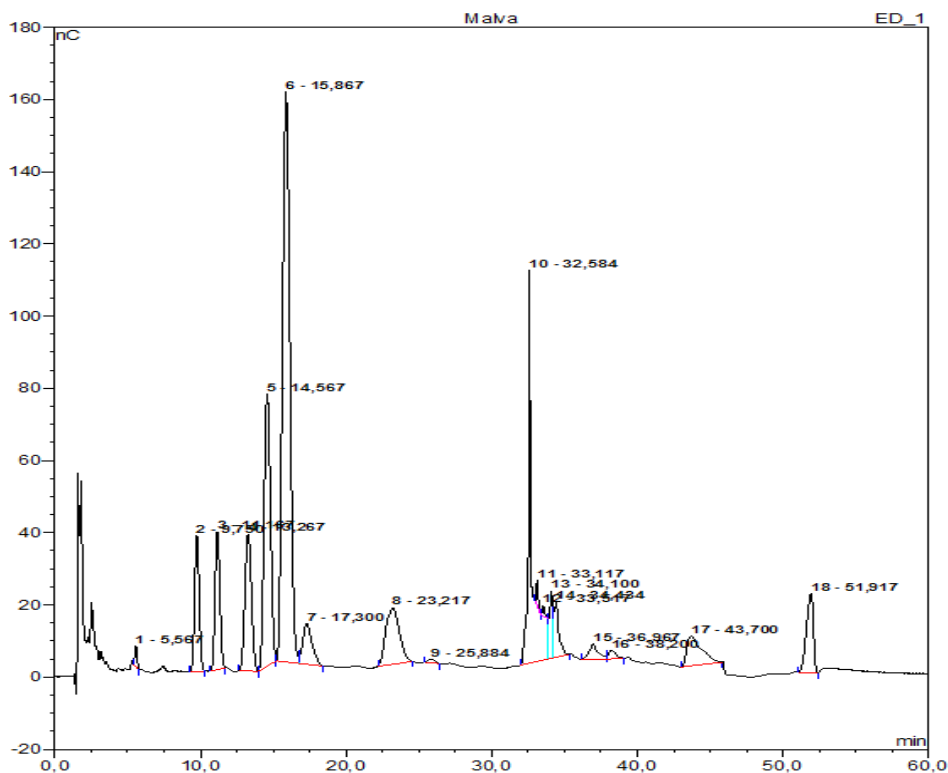


Figure 5. Profil HPAEC des oses constitutifs de polysaccharides hydrosolubles.

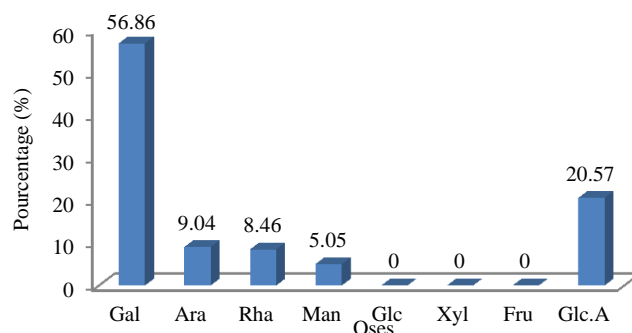


Figure 6. Pourcentage des oses constitutifs de polysaccharides hydrosolubles.

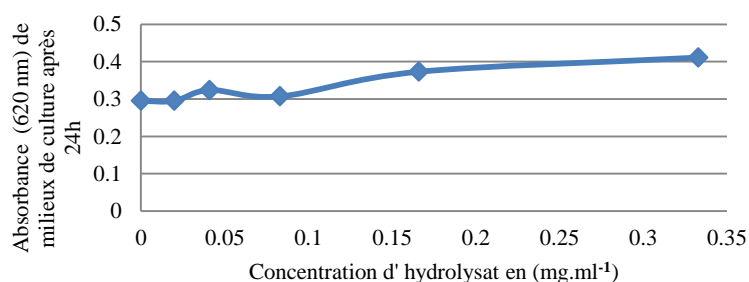


Figure 7. Croissances de *B. longum* après 24 heures en milieu de culture supplémenté par des hydrolysats des polysaccharides hydrosolubles de feuilles de *M. parviflora* à différentes concentrations, estimé par mesure des absorbances à 620 nm.

### CONCLUSION

L'étude de la composition de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora* révèle la prédominance des oses neutres. L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique pendant 5 heures à 80°C semble donner les meilleurs résultats. L'analyse des polysaccharides hydrosolubles montre une hétérogénéité et une diversité d'oses; on trouve, en fait, les oses neutres et acides (pentoses et hexoses). Ils sont constitués principalement de galactose, d'acide glucuronique, d'arabinose, de rhamnose, et de mannose. L'action prébiotique des oligosaccharides issus des hydrolysats partiels des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *M. parviflora* sur *B. longum* est appréciable.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions le Laboratoire Protection des Écosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla pour son soutien financier. Ainsi que le Laboratoire de génie chimique et biochimique à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand (France) pour sa collaboration.

## RÉFÉRENCES

- Al Assaf, S., Phillips, G.O. et Williams, P.A. 2007. Studies on *Acacia* exudate gums. Part I: the molecular weight of *Acacia* senegal gum exudates. *Food Hydrocolloids*, 19: 647-660.
- Aldington, S., Fry, S. 1993. Oligosaccharins. *Adv. Bot. Res.*, 19: 1-101.
- Atkhamova, S.K., Rakhimov, D.A., Kristallovieh, E.L., Karimdzhanov, A.K., et Ismailov, A. I. 1997. Plant polysaccharide. VI. Polysaccharides of representatives of the Malvaceae family. *Chemistry of Natural Compounds*, 33(5): 590- 593.
- Audigie, C., Figarella, J. et Zonszain, F. 1984. *Manipulations d'analyse biochimique*. Ed. Doin, Paris, p. 3-4.
- Autran, J.C. 1991. *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. Ed. Tec et Doc, Paris, p. 115-137.
- Berche, P., Gaillard, J.L., Simonet, M. 1988. *Bactériologie*. Flammarion, Paris, p. 595-599.
- Blumenkrantz, N. et Asboe-Hansen, G. 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54: 484-489.
- Delattre, C. 2005. *Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes*. Thèse de doctorat de l'université de Picardie Jules Verne, Valois Santerre, p. 5-10.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traore, A., Coulibaly, K. et Maiga, A. 2004. Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Chimie*, 7: 1073-1080.
- Doat, J. 1974. Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des gommes et des bois tropicaux. *Revue Bois et Forêts Tropiques*, 156: 63-74.
- Ebringerova, A., Kardosova, A., Hromadkova, Z. et Hribalova, V. 2003. Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, 74: 52-61.
- Genestie, B. 2006. *Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales: approches méthodologiques*. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, p. 30-50.
- Ghatak, S., Misra, S., Toole, B.P. 2002. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.*, 277(41): 38013-38020.
- Kamerling, G.L., Boons, G.L., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N. et Voragen, A. 2007. *Comprehensive glycoscience*. Ed. Elsevier, vol. 2, Paris, p. 654-681.
- Lambin, S. et German, A. 1969. *Précis de microbiologie*. Ed. Masson et cie, Paris, 515 p.
- Liu, G., Casqueiro, J., Gutierrez, S., Kosalkova, K., Castillo, N.I., Martin, J.F. 2001. Elicitation of penicillin biosynthesis by alginate in *Penicillium chrysogenum*, exerted on pcbAB, pcbC, and penDE genes at the transcriptional level. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11(5): 812-818.
- Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, Cl. 1987. *Les milieux de culture*. Ed. Doin, Paris, 36 p.
- Monsigny, M., Petit, C. et Roche, A.C. 1988. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Biochemistry*, 175: 525-530.
- Paulsen, B.S., Olafsdottir, E.S. et Ingolfssdottir, K. 2002. Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. *Journal of Chromatography A*, 967: 163-171.

- Petit, E., Papy, D., Muller, G., Caruelle, J.P., Courtois, J. 2004. Controlled sulfatation of natural anionic bacterial polysaccharides can yield agents with specific regenerating activity *in vivo*. *Biomacromolecules*, 5(2): 445- 452.
- Pineo, G.F. et Hull, R.D. 1997. Low-molecular-weight heparin: prophylaxis and treatment of venous thromboembolism. *Annu. Rev. Med.*, 48: 79-91.
- Ruiz, G. 2005. *Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges*. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, p. 36-38.
- Rousseau, V. 2004. *Évaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale*. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Cedex 4, pp. 42-54.
- Tomoda, M., Kanari, M., Gonda, R. et Shimizu, N. 1989. A reticuloendothelial system-activating glycan from the seeds of *Malva verticillata*. *Phytochemistry*, 28: 2609-2611.
- Wang, Q. et Fang, Y. 2004. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography B*, 812: 309–324.
- Wu, Y., Cui, S.W., Tang, J., Wang, Q. et Gu, X. 2007. Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited *Sterculia* seeds. *Carbohydrate Polymers*, 70: 437–443.

## CARACTÉRISATION PARTIELLE DES POLYSACCHARIDES HYDROSOLUBLES DES FEUILLES D'*Asphodelus tenuifolius* CAVAN (LILIACEAE): EFFET PRÉBIOTIQUE DES OLIGOSACCHARIDES ISSUS DE L'HYDROLYSE DES POLYSACCHARIDES

BOUAL Zakaria<sup>1\*</sup>, KEMASSI Abdellah<sup>1</sup>, MICHAUD Philippe<sup>2</sup>  
et OULD EL HADJ Mohammed Didi<sup>1,3</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratoire Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides  
Université Kasdi Merbah-Ouargla, BP 511 Ouargla 30000 Algérie, Email: biozakaria@yahoo.fr

<sup>(2)</sup>Laboratoire des Glucides (EPMV) CNRS FRE2779, IUT/GB, UPJV, Avenue des Facultés  
Le Bailly 80025 Amiens Cedex, France

<sup>(3)</sup>Laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques, Université Kasdi Merbah-Ouargla  
BP 511 Ouargla 30000 Algérie

**Résumé-** Les polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Asphodelus tenuifolius* Cavan (Liliaceae), une plante spontanée à caractère médicinal de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien), sont obtenus par extraction à l'eau distillée, à la température ambiante pendant 24 heures, après élimination des extraits éthanoliques. Leur précipitation est faite par l'éthanol à 75%. Le rendement massique de l'extrait polysaccharidique est de 0.65%. La composition de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles après lyophilisation, donne 18.33±2.08% d'humidité, 23.66±1.52% de cendres totales, 26.13±0.37% de protéines totales, et 28.96±1.12 d'oses totaux. Parmi les oses, 67.50±0.94% sont des oses neutres et 32.49±0.26% des oses acides. L'hydrolyse des polysaccharides par l'acide trifluoroacétique à 4 M durant 5 heures à 80°C, laissent remarquer après analyse par chromatographie sur couche mince (CCM), que les polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* sont des hétéropolysaccharides acides. L'analyse par chromatographie échangeuse d'anions de haute performance à détecteur ampérométrique pulsé (HPAEC-PAD) des oses constitutifs montre une prédominance de mannose à 39.25% et de glucose à 31.55%, suivie de 10.92% de l'acide glucuronique et 8.9% d'arabinose. Le rhamnose et le xylose sont présents à faible pourcentage, soit 5.22% et 4.14% respectivement. L'hydrolysats partiel de l'extrait stimule de manière significative pour 0,1 DO après 24 heures, la croissance de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* et l'action prebiotique des oligosaccharides issus de ces hydrolysats sur cette souche est notable.

**Mots clés:** Polysaccharides, *Asphodelus tenuifolius*, médicinal, oligosaccharides, prebiotic.

### PARTIAL CHARACTERIZATION AND PREBIOTIC EFFECT OF WATER SOLUBLE POLYSACCHARIDES EXTRACTED FROM ONE SAHARIAN MEDICINAL PLANT: *Asphodelus tenuifolius* CAVAN (LILIACEAE)

**Abstract-** *Asphodelus tenuifolius* Cavan. (Liliaceae), a spontaneous plant used as a traditional medicine in Ghardaïa (Septentrional Sahara Algerian). This paper reports the extraction and partial characterization of water-soluble polysaccharides from *A. tenuifolius* leaves. These polysaccharides were obtained by elimination of the ethanol extract and sequential extraction in distilled water, followed by precipitation in 75% ethanol. The yield of extract is 0.65% (w/w). The crude water soluble polysaccharide extracts were further characterized and revealed the average values 18.33±2.08% moisture, 23.66±1.52% ash, 26.13±0.37% proteins and 28.96±1.12% carbohydrates, among them 32.49±0.26% are uronic acid and 67.50±0.94% are neutral monosaccharides. The acid hydrolysis 4M TFA at 80°C for 5 h is suggested to be more effective in releasing monomers. Thin layer chromatography (TLC) analysis of hydrolysats shows that the extract is constituted of heteropolysaccharides acid. The identification of monosaccharide composition by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) method shows 39.25% of mannose, 31.55% of glucose, 10.92% of glucuronic acid, 8.9% of arabinose, 5.22% of rhamnose and 4.14% of xylose. The partial hydrolysate stimulate significantly for 0,1 DO after 24 hours, the multiplication of *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* and prebiotic effect of the oligosaccharides from these hydrolysates on this are very likely.

**Keywords:** Polysaccharides, *Asphodelus tenuifolius*, medicinal, oligosaccharides, prebiotic.



## Introduction

Les herbes officinales, contenant des polysaccharides sont largement utilisées pour le traitement des maladies dans la médecine traditionnelle et moderne, comme *Linum usitatissimum* (lin), utilisé dans le cas de la constipation ou de troubles fonctionnels du colon, action émolliente et calmante (anti-inflammatoire) d'*althaea rosea*, activité hypoglycémique d'*Hibiscus moscheutos*, etc. Ces espèces appartiennent à des familles botaniques caractéristiques, comportant des cellules spécialisées, dites cellules mucilagineuses ou cellules à mucilages sécrétrices de polysaccharides. Ces cellules sont présentes dans différents organes végétaux [1].

Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles sources de molécules végétales, afin de mettre au point de nouveaux principes actifs ou de découvrir des analogues de structures des molécules existantes [2]. Cependant, la flore spontanée à caractère médicinal du Sahara Septentrional Est algérien, ainsi que les relations entre l'homme dans cette bande aride, et les espèces végétales méritent une attention particulière dans cette zone saharienne.

Face à ce constat, le présent travail est une étude des polysaccharides hydrosolubles de quelques plantes spontanées [3], à caractère médicinal de la région de Ghardaïa. L'objectif recherché, vise une contribution pour élargir le spectre des composés biologiques actifs, et d'identifier de sources de polysaccharides et d'oligosaccharides qui pourront devenir des substituts de drogues synthétiques.

## 1.- Matériel et méthodes

### 1.1.- Matériel végétal

*Asphodelus tenuifolius* (Liliaceae), est une plante spontanée très utilisé dans la médecine traditionnelle par la population de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien) en tisane, en poudre et en pommade pour les traitements des fièvres, des indigestions, des constipations et des lésions cutanées [4]. Les feuilles d'*A. tenuifolius*, récoltées de l'Oued Nechou (région de Ghardaïa) en Mars 2008. Les feuilles sont séchées à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante [5]; durant trois semaines. Les feuilles ainsi séchées sont conservées dans des boîtes dans un milieu sec à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse.

### 1.2.- Etude des polysaccharides

#### 1.2.1.- Extraction des polysaccharides

Les feuilles séchées sont écrasées et prétraitées par de l'éthanol 75% durant 5 heures, à température ambiante et sous agitation douce; puis filtrées à travers un filtre de porosité 100 µm, afin d'éliminer les composés solubles dans l'éthanol, tels que les polyphénols, les oligosaccharides, les oses simples et les acides aminés [6]. Le résidu des feuilles prétraitées, est séché une seconde fois à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à la température ambiante pendant 48 heures [7]. Les feuilles ainsi séchées sont macérées dans 2 volumes de l'eau distillée froide, pendant 24 heures à la température ambiante. Le mélange est filtré à travers un filtre de porosité 100 µm. Le filtrat est concentré à 60°C jusqu'à l'obtention du 1/3 du volume initial, dans un évaporateur rotatif. Les polysaccharides du concentrât sont précipitées à l'aide de

3 volumes d'éthanol à 75% pendant 24 heures à une température de 4°C [7]. Après centrifugation à 3560g pendant 10 mn [8, 9], le culot est récupéré puis lavé 3 fois par éthanol à 75% [7], avant d'être lyophilisé [10]. Le lyophilisat obtenu, représente l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles, pour l'étude de la composition qualitative et quantitative des polysaccharides bruts.

### 1.2.2.- Composition des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles

Les principaux constituants chimiques de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles sont caractérisés par des réactions de coloration. Il s'agit du taux de protéines, de la teneur en oses constitutifs, neutres, acides, de l'humidité relative et des cendres.

L'humidité est déterminée par une dessiccation de l'extrait brut à la température de 103±2°C dans une étuve à la pression atmosphérique, jusqu'à masse constante [10]. Les cendres totales sont déterminées par incinération de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles lyophilisé dans un four à moufle électrique de type Heraeus 6072. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Bradford [11]. La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie [11]. Le dosage des oses constitutifs des polysaccharides repose sur la réaction des dérivés furfuriques obtenus par action à chaud, d'un acide concentré comme l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pour divers composés aromatiques, telle que le résorcinol (1,3-dihydroxybenzène) pour le dosage des oses neutres [12], et le méta-hydroxydiphényle pour le dosage des acides uroniques [13]. La concentration en oses neutres est obtenue par référence à une gamme étalon d'arabinose et celle des oses acides avec une gamme étalon d'acide glucuronique [12].

### 1.2.3.- Caractérisation des polysaccharides

#### 1.2.3.1.- Chromatographie sur couche mince des oses constitutifs des polysaccharides

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse [14].

- **Hydrolyse des liaisons glycosidiques:** 25 mg de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles lyophilisés des feuilles d'*A. tenuifolius* est hydrolysé par 2 ml d'acide trifluoroacétique 4 M, à 80°C pendant 5 heures, dans des tubes fermés [14]. Après refroidissement, l'hydrolysate est centrifugé à 2000 g pendant 5mn. Le surnageant est récupéré. L'acide est évaporé à l'aide d'un dessiccateur sous vide. Une fois l'hydrolyse effectuée, les monosaccharides libérés, sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

- **Préparation des solutions standard:** 25 mg de chaque ose dont le galactose, l'arabinose, le glucose, le xylose, le mannose, le fructose et l'acide glucuronique, est dissous dans 2,5 ml d'eau distillée.

- **Types des plaques :** Ce sont des plaques prêtes à l'emploi, de gel de silice (Silica gel 60 F254) de 0.25 mm d'épaisseur sur feuille de verre.

- **Préparation de phase mobile :** Elle est constituée de butanol- acide acétique-eau dans les proportions de 2-1-1 [15].

- **Réalisation de CCM et révélation:** Dans un premier stade, on vérifie qualitativement la composition en oses des hydrolysats en déposant en parallèle, sur une même plaque, une série des étalons: arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, fructose et d'acide glucuronique ainsi que la solution d'hydrolysate. A 1,5 cm du bas de la plaque, on dépose à intervalles réguliers 10 µl de chaque solution correspondant à un poids de 100 µg d'ose, on introduit la plaque dans une cuve étanche dont l'atmosphère est saturée par le mélange de la phase mobile. Le développement du chromatogramme est effectué de façon ascendante jusqu'à le front. Après séchage, la révélation du chromatogramme est faite en pulvérisant sur la plaque le réactif de NIGRUM, et en séchant à l'étuve à 105°C pendant 10 à 15 mn [15]. Le facteur de rétention (Rf) est calculé pour chaque constituant.

#### 1.2.3.2.3.- Caractérisation quantitative des résidus glycosidiques par HPAEC-PAD

La chromatographie échangeuse d'anions haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) permet de confirmer les compositions en oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles et donner les pourcentages en oses. Les différents oses sont identifiés par leur temps de rétention spécifique et quantifiés après intégration du signal (Chromleon management system Dionex) par comparaison avec les monosaccharides de référence [1].

- **Préparation des échantillons:** Les polymères (3 mg, 0.6% m/v) sont placés dans des tubes hermétiques pour être hydrolysés à l'acide trifluoroacétique 4 M pendant 5 heures à 80°C dans un bain Marie à sec thermostaté. Ils sont ensuite lyophilisés et remis en solution dans 1 ml d'eau distillée.

- **Application d'HPAEC-PAD:** Il est injecté 25 µl de l'échantillon dans une colonne de type CarboPac PA 1 avec un débit d'élution de 1 ml.mn<sup>-1</sup> à l'aide d'un système isocratique d'une solution de NaOH 16 mM pendant 10mn suivie d'un gradient d'acétate de sodium 600 mM en 4 étapes, dont pour les premières 10mn à 0% de B-100% de A, puis de 10 à 40 mn à 0% à 100% de B, puis 40 à 45 mn à 100% de B et en fin de 45 à 60 mn de 100 à 0% de B.

#### 1.2.4.- Effet prébiotique des hydrolysats partiels des polysaccharides sur *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*

Effet prébiotique, c'est un terme désigne des additifs ou des compléments alimentaires non digestibles qui affectent de façon bénéfique l'hôte en stimulant sélectivement la croissance ou l'activité de certaines bactéries intestinales [16]. Les oligosaccharides issus de dégradation de polysaccharides naturels comme les fructooligosaccharides, les galacto-oligosaccharides, et les arabinogalactooligosaccharides sont étudiés pour leur action prébiotique [17]. Il est testé l'activité des oligosaccharides issus de l'hydrolyse partielle des 3 extraits polysaccharidiques.

##### 1.2.4.1.- Hydrolyse partiel des polysaccharides

10 mg de chaque extrait brut de polysaccharides hydrosolubles lyophilisé est hydrolysé par 2 ml d'acide trifluoroacétique 2 M, à 80°C pendant 3 heures, dans des tubes fermés. Après refroidissement, l'hydrolysate est centrifugé à 2000 g pendant 5mn. Le surnageant est récupéré. L'acide est évaporé à l'aide d'un dessiccateur sous vide [16].

#### 1.2.4.2.- Matériel biologique

L'activité est testée sur *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* (Enterobactériaceae), bactérie commensale vivant dans le tube digestif de l'homme et des animaux [18].

#### 1.4.4.3.- Milieu de culture

*Klebsiella pneumoniae pneumoniae* est cultivée sur milieu Trypticase-Soja Bouillon (TSB). Il est constitué de 17 g.l<sup>-1</sup> peptone tryptique de caséine, 3 g.l<sup>-1</sup> peptone papainique de soja, 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose, 5 g.l<sup>-1</sup> de NaCl et de 2,5 g.l<sup>-1</sup> de phosphate dipotassique. Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 15 mn. Le pH final est ajusté à 7,3 [19].

**- Mesure de l'activité biologique:** L'activité prébiotique est définie après 24 heures de contact à 37°C, une croissance bactérienne, mesurée par absorbance à la longueur d'onde de 620 nm, supérieur de 0,1 DO par rapport au témoin négatif (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) [16].

Il est distribué dans un premier temps, dans une série d'écouvillons stériles sur un volume de 1 ml de milieu de culture, des concentrations décroissantes de l'hydrolysate, en régression de 1/2, l'écouvillon représente l'étalon est constitué seulement d'un millilitre (1ml) de milieu de culture. Puis il est ajouté dans chaque écouvillon 1 ml de la suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance, diluée de façon à obtenir une concentration finale d'environ 10<sup>6</sup> bactéries/ ml [20]. 24 heures après culture à 37°C, les mesures des absorbances à 620 nm sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre de type Clinical Chemistry System RA-50 contre une référence constituée de milieu de culture stérile.

## 2.- Résultats et discussions

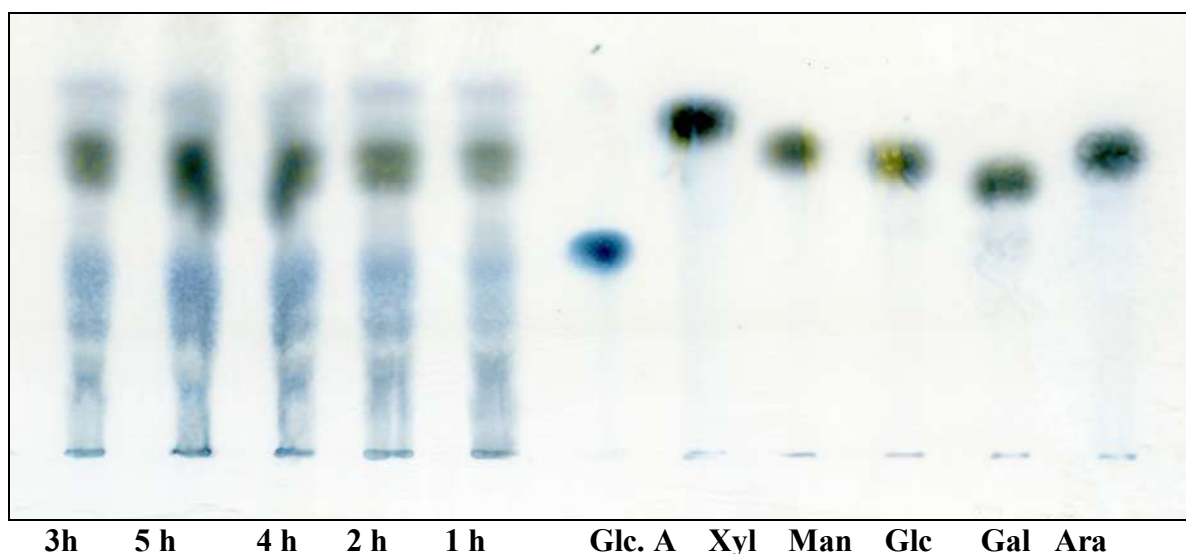
Le rendement de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* par rapport à la matière sèche est de 0,65%. Il semble faible par rapport à celle d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae), soit 1,33% [9]. SEPULVEDA et al. (2007), signalent 4,9±0,6% d'humidité dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae), alors qu'*A. tenuifolius* renferme 18,33±2,08% [10]. KARDOSOVA et MACHOVA (2006) notent dans l'extrait de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae) 27,9% de cendres. Il est remarqué dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* 23,66±1,52% [20]. La teneur moyenne en protéines de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* est de 26,13±0,37%. SEPULVEDA et al. (2007), notent 14,2% de protéines dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Liliaceae), paraît inférieur à celle d'*A. tenuifolius* soit 26,13±0,37% [8]. La teneur moyenne de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* en oses totaux est de 28,96±1,12%. Parmi les oses, 67,50±0,94% sont des oses neutres et 32,49±0,26% des oses acides (tab. I). Il est trouvé 79,95±2,12% d'oses totaux dans l'extrait polysaccharidique des feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae) [21]. Cette valeur semble très élevée de celle obtenue chez *A. tenuifolius* soit 28,96±1,12%. Le pourcentage des oses acides dans l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles de feuilles d'*A. tenuifolius* soit 32,49±0,26%, est supérieur à celle de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles de feuilles d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae) soit 14,04±0,32% [21]. Le rapport des pourcentages (oses acides/oses neutres) pour l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* est de 0,47, semble élevé au vu de celle d'*Aloe barbadensis* (Liliaceae), soit 0,22 [21].

L'emploi d'une solution d'acide trifluoroacétique 4 M, conduit à une hydrolyse significative d'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles. L'allure générale des taches de la figure 1, après 5 heures, montre une similitude des profils chromatographiques, qui semble montrer la fragilité des polysaccharides hydrosolubles des feuilles de *A. tenuifolius*. Après 3 heures, se note l'éclaircissement de la première large tache de  $R_f$  0,08 pouvant, s'expliquer par la dégradation des fragments d'oligosaccharides suite à la durée de l'hydrolyse. Il se remarque une progression de l'intensité des taches correspondant aux oses simples, de  $R_f$  0,41 ; 0,45 et 0,30. Ceci traduit l'hydrolyse des liaisons osidiques spécialement les liaisons uronosidyles et la libération des oses simples. KAMERLING et *al.* (2007) signalent que les liaisons uronosidyles sont extrêmement stables [22]. La détermination de la composition en oses constitutifs par CCM, montre une hétérogénéité et une diversité des oses neutres et acides, pentoses et hexoses. L'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius*, renferme des hétéropolysaccharides acides. Ils sont constitués d'arabinose, de glucose, de xylose, d'acide glucuronique et probablement de galactose et de mannose (fig. 1).

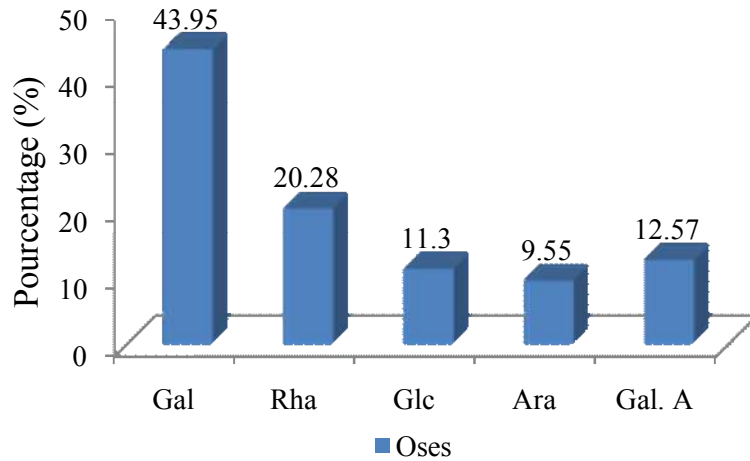
**Tableau I.-** Composition de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius*

Humidité (%)	Cendre (%)	Protéines (%)	Teneur en oses (%)		
			Neutres	acides	totales
18,33 ± 2,08	23,66 ± 1,52	26,13±0,37	15,50±0,62	12,67±0,42	28,18±0,94

La figure 2 laisse apparaître les résultats d'analyse par HPAEC-PAD de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius*. Le profil des oses montre une prédominance de mannose à 33,45% et de glucose à 26,89%, suivie de 9,31% de l'acide glucuronique et 7,59% d'arabinose. Le rhamnose et le xylose sont présents en faible pourcentage avec 4,45% et 3,53% respectivement. Le rapport des pourcentages des oses majeurs d'*A. tenuifolius* pour Man/Ara est de 4,40; Glc/Ara de 3,54; Glc.A/Ara de 1,22; donc on peut l'exprimer par Man /Glc /Glc.A /Ara, soit 4,40 /3,54 /1,22 /1,0.

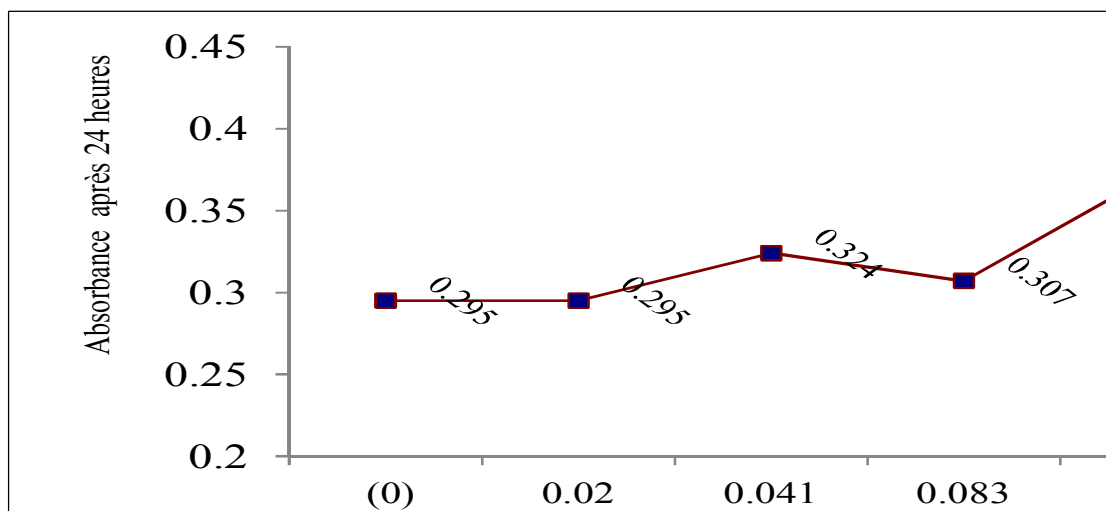


**Figure 1.-** Suivi par CCM de l'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique 4 M à 80°C, en fonction du temps (heure) de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles feuilles d'*A. tenuifolius*



**Figure 2.-** Composition en oses de l'hydrolysate de polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* effectué par HPAEC-PAD

Les hydrolysats partiels des polysaccharides hydrosolubles de feuilles d'*A. tenuifolius*, dans une moindre mesure, engendrent une amélioration de la croissance de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* comparativement aux témoins (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) (fig. 3). Les hydrolysats partiels d'*A. tenuifolius*, montrent une croissance fluctuante, pour les faibles concentrations et n'est effective qu'à partir de 0,166 mg/ml. Les fluctuations à des faibles concentrations de la multiplication dans les milieux de culture contenant des hydrolysats partiels des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* révèlent les perturbations métaboliques consécutives au changement de source carbonée [23]. GENESTIE [16] attribue un caractère prébiotique à la préparation oligosaccharidique testée dès lors que celle-ci engendre un accroissement de 0,1 DO après 24 heures de culture, comparativement aux valeurs mesurées sur témoin négatif (milieu de culture sans addition d'oligosaccharides) pour certaines bactéries intestinales. Cela est remarqué seulement à 0,333 mg/ml.



**Figure. 3.-** Croissances de *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* après 24 heures en milieu de culture supplémenté par les hydrolysats à différentes concentrations (absorbances à 620 nm)

### 3.- Conclusion

L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique, durant 5 heures à 80°C semble donner les meilleurs résultats, de l'étude des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* après élimination des extraits éthanoliques, à la température ambiante pendant 24 heures. La composition de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles après lyophilisation, montre que les oses neutres dominent comparativement aux oses acides. L'humidité semble élevée, résultant de l'effet hygroscopique des polysaccharides après lyophilisation, d'où la nécessité d'avoir des techniques de conservation plus adéquates. Les protéines restent le deuxième constituant majeur dans les extraits bruts des polysaccharides hydrosolubles, par leur co-précipitation avec les polysaccharides par l'éthanol. L'analyse qualitative par CCM de la composition en oses des polysaccharides hydrosolubles montre une hétérogénéité et une diversité des oses; neutres et acides, pentoses et hexoses. L'analyse par HPAEC-PAD de la composition en oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles, issus des feuilles d'*A. tenuifolius*, montre une prédominance de mannose et de glucose. Le rhamnose et le xylose sont présents en faible proportion. L'action prébiotique des oligosaccharides issus des hydrolysats partiels des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'*A. tenuifolius* sur *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* est appréciable.

### Références

- [1].- Warand J., 2004.- Etude structurale et propriétés en solution des polysaccharides constitutifs de mucilage de lin (*Linum usitatissimum*). Thèse de doctorat de l'université de Picardie Jules Verne, 238 p.
- [2].- Deters A. M., Lengsfeld C. et Hensel A. 2005.- Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 102: 391-399.
- [3].- Ozenda P., 1983.- Flore du Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 617 p.
- [4].- Hammiche H. et Maiza K., 2006.- Traditional medicine in central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'Ajjer. *Journal of ethnopharmacology*, vol. 105: 358-367.
- [5].- Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traoré A., Coulibaly K. et Maiga A., 2004.- Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. *Chimie*, vol. 7: 1073-1080.
- [6].- Wu Y., Cui S. W., Tang J., Wang Q. et Gu X., 2007.- Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. *Carbohydrate polymers*, vol. 70: 437-443.
- [7].- Ebriverova A., Kardosova A., Hromadkova Z. et Hribalova V., 2003.- Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia*, vol. 74: 52-61.
- [8].- Sepulvera E., Saenz C., Aliaga E., et Aceituna C., 2007.- Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of arid environments*, vol. 68: 534-545.

- [9].- Biriganine G., Vray B., Vercruyssen V., Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M. et Duez P., 2004.- Polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago palmata* Hook induce nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by interferon- $\gamma$ -activated macrophages. Nitric oxide, vol. 12: 1-8.
- [10].- Audigie C., Figarella J. et Zonszain F., 1984.- Manipulations d'analyse biochimique. Ed. doin, Paris: 3-4.
- [11].- Autran J. C., 1991.- Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. Tec et Doc, Paris: 115-137.
- [12].- Monsigny M., Petit C. et Roche A. C., 1988.- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. Analytical biochemistry, vol. 175: 525-530.
- [13].- Blumenkrantz N. et Asboe-Hansen G., 1973.- New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical biochemistry, vol. 54: 484-489.
- [14].- Ruiz G., 2005.- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 36-38.
- [15].- Paulsen B. S., Olafsdottir E. S., et Ingolfsson K., 2002.- Chromatography and electrophoresis in separation and characterization of polysaccharides from lichens. Journal of chromatography a, vol. 967: 163–171.
- [16].- Genestie B., 2006.- Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales: approches méthodologiques. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 30-50.
- [17].- Delattre C., 2005.- Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat de l'université de Picardie Jules Verne, Valois Santerre: 5-10.
- [18].- Berche P., Gaillard J. L., Simonet M., 1988.- Bactériologie. Flammarion, Paris: 595-599.
- [19].- Marchal N., Bourdon J. L., Richard Cl., 1987.- Les milieux de culture. Ed. Doin, Paris, 36 p.
- [20].- Kardosova A. et Machova E., 2006.- Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. Fitoterapia, vol. 77: 367–373.
- [21].- Femenia A., Sanchez E. S., Simal S. et Rossello C., 1999.- Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. Carbohydrate polymers, vol. 39: 109–117.
- [22].- Kamerling L., Boons G. L., Lee Y. C., Suzuki A., Taniguchi N. et Voragen A., 2007.- Comprehensive glycoscience. Ed. Elsevier, vol. 2, Paris: 654-681.
- [23].- Lambin S. et German A., 1969.- Précis de microbiologie. Ed. Masson et c<sup>ie</sup>, Paris, 515 p.



## Etude comparative des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits éthanoliques des graines de deux plantes spontanées à caractère médicinales récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie)

BOUAL Z.<sup>1</sup>, OULD EL HADJ-KHELIL A.<sup>1</sup>, KEMASSI A.<sup>1</sup>, DADDI BOUHOUN M.<sup>1</sup>, MICHAUD P.<sup>2</sup> & OULD EL HADJ M. D.<sup>1,3</sup>

1- Laboratoire Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides

Université Kasdi Merbah-Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie

2- Laboratoire des Glucides (EPMV) CNRS FRE2779, IUT/GB, UPJV

Avenue des Facultés Le Bailly, 80025 Amiens Cedex, France

3- Laboratoire de Biogéochimie des Milieux Désertiques

Université Kasdi Merbah-Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie

Received: November 25, 2011; Accepted: December 29, 2011

Corresponding author Email [biozakaria@yahoo.fr](mailto:biozakaria@yahoo.fr)

Une étude comparative des activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits éthanoliques des graines de *Plantago notata* Lagasca. (Plantaginaceae) et d'*Astragalus armatus* Lam. (Fabaceae) récoltés dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie), est entreprise. Les teneurs en composés phénoliques de l'extrait éthanolique des graines d'*A. armatus*, sont de  $2.78 \pm 1.04$  mg équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche /g et celles de *P. notata* de  $4.81 \pm 1.24$  mg équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche/g. Pour les flavonoïdes, ils sont de  $0.299 \pm 0.005$  mg équivalent de la rutine par gramme d'extrait /g et  $0.87 \pm 0.00$  mg équivalent de la rutine par gramme d'extrait /g dans les graines respectivement pour *A. armatus* et *P. notata*. Les activités antioxydantes révèlent  $4.18 \pm 0.99$  mg équivalent vitamine C par gramme de l'extrait sec /g pour l'extrait éthanolique des graines de *P. notata* et  $2.59 \pm 0.36$  équivalent vitamine C par gramme de l'extrait sec/g pour l'extrait éthanolique des graines d'*A. armatus*. L'étude du pouvoir antimicrobien chez *Escherichia coli* révèle une zone d'inhibition de  $8.3 \pm 0.2$  mm pour *A. armatus* et  $7.3 \pm 0.2$  mm pour *P. notata*. Chez *Salmonella thyphimurium*, elle est de  $7.1 \pm 0.2$  pour *A. armatus* et  $11 \pm 1.0$  mm pour *P. notata*. Les diamètres des zones d'inhibition sont de  $8.1 \pm 0.2$  mm et  $13.0 \pm 0.5$  mm pour les extraits de *P. notata* et *A. armatus* respectivement, pour la souche de levure *Candida albicans*. Pour *Pseudomonas aeruginosa* ( $5.5 \pm 0.05$  mm) et *Staphylococcus aureus* ( $7.3 \pm 0.2$ ), l'extrait de *P. notata* laisse remarquer des zones d'inhibition appréciables, mais aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques imprégnés de l'extrait éthanolique des graines d'*A. armatus*.

**Mots clés:** Antioxydant, antimicrobien, polyphénols, extraits, plante spontanée.

### 1.- Introduction

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. Les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques. Le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, et la toxicité des antioxydants synthétiques, a conduit à la recherche de substances naturelles dotées d'activité antimicrobienne et antioxydante (GURIB, 2006).

En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées par l'organisme humain, au cours des diverses attaques sont éliminées ou piégées par des molécules douées de propriétés antioxydantes. Le rôle des molécules à propriétés antioxydantes dépasse de loin celui de simples piègeurs ou de suppresseurs de radicaux libres, ils sont efficaces dans la prévention et/ ou dans le traitement des affections parasitaires et non parasitaires. Les antioxydants se trouvent dans toutes les plantes, ils sont qualifiés de métabolites secondaires. Ces composés présentent plusieurs propriétés pharmacologiques, telles que les propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, anti-cancérigènes, anti-thrombiques, anti-athérogéniques, anti-pyrétiques, analgésiques, etc. (GÓMEZ et al., 2006; MUANDA et al., 2009).

Face à ce constat, le présent travail est étude comparative de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits éthanoliques des graines de deux plantes spontanées à caractère médicinales récoltées dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie).

## 2.- Matériel et méthodes

### 2.1.- Matériel biologique

Le matériel biologique se compose de souches bactériennes Gram<sup>-</sup> représentées par *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium* et Gram<sup>+</sup> tel que *Staphylococcus aureus*, mais aussi de levure comme *Candida albicans* provenant de différents prélèvements cliniques du laboratoire d'analyses médicales IBN ROCHD Ghardaïa, et de plantes spontanées connues au Sahara septentrional Est algérien pour leur qualité médicinale (BATTANDIER, 1882; TRABUT, 1935; VOISIN, 1987). Les échantillons de plantes ont été récoltés d'Oued Nechou de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie), entre les mois de Mai et juillet 2010. Il s'agit de *Plantago notata* Lagasca. (Plantaginaceae) et *Astragalus armatus* Lam. (Fabaceae)

***Plantago notata* Lagasca. (Plantaginaceae):** C'est une plante herbacée annuelle, à feuilles allongées. Les nervures principales sont parallèles, à pétiole peu distinct, les fleurs blanches, sont groupées en épis à l'extrémité des hampes dépourvues de feuilles. La bractée et les sépales à longs poils, donnent à l'épi un aspect laineux. Les sépales sont sans nervure (OZENDA, 1983). Le nom vernaculaire est l'Inem (TRABUT, 1935). Les feuilles et les graines sont utilisées par les indigènes comme cicatrisante des blessures, pour les traitements des inflammations de la gorge et des ulcères (VOISIN, 1987).

***Astragalus armatus* Lam. (Fabaceae):** Une plante très épineuse, rameaux écailleux, glabres, les pétioles devenant durs et aigus, folioles petites, très caduques, calice renflé en vésicule enferme le fruit (OZENDA. 1983). Le nom vernaculaire est Gundoul. Les fruits sont utilisés pour traiter les blessures, et contre la constipation (BATTANDIER, 1882; TRABUT, 1935).

### 2.2.- Extractions par macération des phénols totaux

Après séchage, les graines de *P. notata*, d'*A. armatus* ont été broyées pour obtenir une poudre fine, qui servira pour la préparation des extraits.

A 20g de poudre de graines de chaque plante est ajouté 200 ml d'éthanol à 80 %. Après 24 heures d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré sur papier filtre et le marc est utilisé dans deux extractions successives pendant vingt-quatre heures dans les mêmes conditions. Les filtrats ainsi obtenus, sont mélangés puis concentrés sous vide à 40 °C au rotor vapor. Les extraits obtenus sont conservés à +5°C jusqu'à leur utilisation.

### 2.3.- Dosage des phénols totaux

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin Ciocalteu (SINGLETON et *al.*, 1999). Ce dosage repose sur le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réducteurs de ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006). Sur 50 µl de chaque extrait dissous dans le méthanol, sont ajustés à 100µl au réactif de Folin Ciocalteu puis dilué 10 fois puis est ajouté 1 ml d'eau distillée. Après 10 min, 500 µl d'une solution de carbonate du sodium à 20% (m/v) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2 heures d'incubation. Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies à l'acide gallique (0-200 µg/ml) et sont exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).

#### **2.4.- Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes fait appel à la méthode de LAMAISON et CARNET (1990); HUANG et *al.* (2004), utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) comme réactif. A 1ml de chaque extrait et du standard, préparés dans le méthanol avec dilutions convenables est ajouté à un volume égal d'une solution de 2% de AlCl<sub>3</sub>. Le mélange est agité, et à 367 nm l'absorbance est lue après 10 minutes d'incubation. Les concentrations des flavonoïdes, sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine (0-35µg/ml), et sont exprimées en milligramme d'équivalent de la rutine par gramme d'extrait (mg EQ/g).

#### **2.5.- Activité Antioxydante totale**

L'activité antioxydante totale des extraits éthanoliques des graines de *P. notata* et d'*A. armatus* a été évaluée par la méthode de PRIETO et *al.* (1999). Le pouvoir antioxydant a été mesuré par spectrophotomètre en utilisant la méthode de phosphomolybdate, basée sur la réduction de phosphomolybdate (Mo<sup>6+</sup>) au (Mo<sup>5+</sup>) par les antioxydants présents dans les extraits. Il est préparé 100 ml d'un mélange des trois solutions 0,6M acide sulfurique, 28 mM phosphate sodium et 4M molybdate ammonium. 200 µl de chaque extrait dilué sont ajoutés 2ml de la solution de phosphomolybdate préparée. Le mélange est placé dans un bain marie à une température de 95°C pendant 90 mn, après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm. L'acide ascorbique utilisé comme référence pour établir une courbe d'étalonnage. L'activité antioxydante est exprimée en milligramme (mg) équivalent en acide ascorbique (AE)/g d'échantillon.

#### **2.6.- Activité Antimicrobienne**

Pour les essais des activités antimicrobiennes il est utilisé la technique de diffusion en milieu gélosés de Muller Hinton en boîtes de Petri.

Pour les essais des activités antimicrobiennes il est utilisé la technique de diffusion en milieu gélosés de Muller Hinton en boîtes de Petri. Les extraits éthanoliques sont solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Des disques absorbants stériles de 4 mm de diamètre, chargés de 3 µl d'extrait sont déposés à la surface d'un milieu gélosé de Muller Hinton préalablement ensemencé avec une suspension microbienne pure (10<sup>6</sup> /ml) en phase exponentielle de croissance. Des témoins sans extrait sont réalisés. L'essai est répété trois fois. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La diffusion de l'extrait dans la gélose permet de suivre l'inhibition et la croissance des germes qui se traduira par une zone claire autour de disque dite zone d'inhibition. L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour de disque contenant l'extrait à tester. La

lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition (PONCE et al., 2003).

### 3.- Résultats et discussion

Sur le tableau I, sont regroupés les résultats de rendements d'extraction, les taux de polyphénols totaux, des flavonoïdes, et les activités anti-oxydantes (AAO) des extraits.

Il apparaît que les rendements d'extraction sont de 6.03% et 7.4% pour *A. armatus* et *P. notata*, respectivement. BOUAZIZ et al.(1999) signalent un rendement de  $34.90 \pm 2.44\%$  de l'extrait méthanolique de la tige et des épines d'*A. armatus*.

Les résultats obtenus de la quantification des phénols totaux montrent que l'extrait éthanolique des graines de *P. notata* est constitué de  $4.81 \pm 1.24$  mgGAE/g de la matière sèche et ce d'*A. armatus* est de  $2.78 \pm 1.04$  mgGAE/g de la matière sèche. KOBEASY et al. (2011), remarquent  $7.43 \pm 0.07$  et  $13.05 \pm 0.10$  mgGAE/g dans les graines et les feuilles de *P. major*, respectivement. Tandis que, BOUAZIZ et al. (1999) n'ont pas détectés aucune valeur dans les extraits méthanoliques des tiges et des épines d'*A. armatus*.

Pour les flavonoïdes, l'extrait éthanolique des graines de *P. notata* est constitué de  $0.87 \pm 0.00$  mg RE/g de la matière sèche, et ce d'*A. armatus* est constitué de  $0.299 \pm 0.005$  mg RE/g de la matière sèche en flavonoïdes. Selon KOBEASY et al. (2011), les graines et les feuilles de *P. major* représentent des teneurs en flavonoïdes, soit  $3.03 \pm 0.03$  et  $6.41 \pm 0.04$  mg Quercetin/g de la matière sèche respectivement. En revanche, l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. armatus* est constitué de  $0.1 \pm 0.01$  mg RE/g (BOUAZIZ et al., 1999). Les taux des flavonoïdes sont inférieur à celle des composés phénoliques, cela indique que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possèdent autres structures chimiques que celle des flavonoïdes (acides phénoliques, tanins...) (KAROU et al., 2005).

L'AAO de l'extrait éthanolique des graines de *P. notata* est de  $4.18 \pm 0.99$  mgVCE/g et celle des graines d'*A. armatus*, est de  $2.59 \pm 0.36$  mgVCE/g. l'étude de GONDA et al. (2010) sur 5 espèces du *Plantago* montrent des activités antioxydantes se situent entre  $0.1722 \pm 0.0573$  et  $0.4124 \pm 0.0701$  mg VCE/g, semblent inférieures de celle de *P. notata*. Tandis que, BOUAZIZ et al. (1999) montrent des activités antioxydantes soit  $5.58 \pm 0.95$  et  $6.46 \pm 1.10$  mg VCE/g dans l'extrait méthanolique de la tige et des épines et des feuilles d'*A. armatus*, semblent supérieures de l'extrait éthanolique des graines d'*A. armatus*. Par ailleurs on obtient aussi une bonne corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités antioxydantes ( $r = 0,92$  par la méthode du phosphomolybdate). Des résultats similaires ont été trouvés par d'autres auteurs qui ont montré qu'il y a une bonne corrélation entre le profil en phénols totaux et l'activité antioxydante des extraits de plantes suggérant ainsi que les composés phénoliques sont bien responsables de l'activité antioxydante de ces extraits (KAROU et al., 2005).

**Tableau I-** Rendement d'extraction, teneur en phénols totaux, en flavonoïdes et activités anti oxydantes (AAO) des extraits éthanoliques des graines de *P. notata* et d'*A. armatus*

	Rendement (%)	Polyphénols (mgGAE/g)	Flavonoïdes (mg RE/g)	Activité anti-oxydante PPM Test(mg VCE/g)
<i>P. notata</i>	7.4	$4.81 \pm 1.24$	$0.87 \pm 0.00$	$4.18 \pm 0.99$
<i>A. armatus</i>	6.03	$2.78 \pm 1.04$	$0.299 \pm 0.005$	$2.59 \pm 0.36$

Les valeurs des diamètres d'inhibition enregistrés se trouvent consignées dans le tableau II. L'étude du pouvoir antimicrobien de l'extrait éthanolique des graines de *P. notata*, montre des

zones d'inhibition de  $7.3\pm 0.2$ mm chez *E. coli* et *S. aureus*,  $5.5\pm 0.05$ mm chez *P. aeruginosa*,  $11\pm 1.0$ mm chez *S. thyphimurium*, et  $8.1\pm 0.2$ mm chez *C. albicans*. Tandis que, l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des graines d'*A. armatus* révèle des zones d'inhibition de  $8.3\pm 0.2$ mm chez *E. coli*,  $7.1\pm 0.2$ mm chez *S. thyphimurium*,  $8.1\pm 0.2$ mm chez *C. albicans*, et aucune zone d'inhibition n'a été observée contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Les extraits testés se sont révélés actifs avec un degré différent, lié au contenu des extraits aux substances à activité antimicrobienne. Au vu des résultats obtenus, il apparaît que toutes les souches microbiennes testées sont inhibées au moins par l'un des extraits, ce qui confirme le spectre large de l'activité antimicrobienne de ces plantes. L'extrait éthanolique des graines de *P. notata* semblent avoir des effets inhibiteurs plus puissants, en présentant des zones d'inhibition de croissance avec toutes les souches microbiennes. Tandis que, l'extrait éthanolique des graines d'*A. armatus* a montré une activité antimicrobienne un peu moindre, aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques imprégnés à la charge de  $3\mu\text{l}$ /disque après fin d'incubation de culture de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ces souches possèdent des potentiels de résistance très élevés contre l'action antimicrobienne de l'extrait. BOUAZIZ et al. (1999) signalent des activités antibactériennes plus importantes contre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, et *S. thyphimurium* avec des zones d'inhibitions 10, 11, 14, 10 mm et aucune activité inhibitrice contre *C. albicans* autour des disques imprégnés à la charge de  $40\mu\text{l}$ /disque de l'extrait méthanolique de la tige et des épines d'*A. armatus*. Tandis que, l'étude BORCHARDT et al. (2008) sur l'activité antimicrobienne d'*Astragalus canadensis* et d'*Astragalus mollissimus* n'ont pas détecté aucune zone d'inhibition contre les espèces étudiées.

**Tableau II-** Diamètres des zones d'inhibition des cultures microbiennes en mm obtenus par des extraits éthanoliques des graines de *P. notata*, d'*A. armatus*

Plantes	Souches microbiennes testées				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>P. notata</i>	$7.3\pm 0.2$	$5.5\pm 0.05$	$7.3\pm 0.2$	$11\pm 1.0$	$8.1\pm 0.2$
<i>A. armatus</i>	$8.3\pm 0.2$	---	---	$7.1\pm 0.2$	$13.0\pm 0.5$
<b>Céfotaxime</b>	$23.5\pm 0.5$	$19.83\pm 0.76$	$20.5\pm 0.5$	$24.33\pm 0.57$	$25\pm 00$

#### 4.- Conclusion

L'étude des propriétés biologiques tels que l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante a concerné les graines de deux plantes spontanées de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie). La détermination des rendements d'extraction ont montré une rentabilité élevée dans les extraits éthanoliques des deux plantes. Le dosage des composés phénoliques dans les deux extraits a révélé des teneurs considérables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes. L'activité antioxydante des extraits a révélé que l'extrait le plus riche en composés phénoliques est l'extrait le plus actif. Le test de l'activité antimicrobienne des extraits a montré que toutes les souches microbiennes testées (bactéries et levure) sont inhibées au moins par l'un des extraits. Les extraits testés se sont révélés actifs avec un degré différent, lié au contenu des extraits aux substances à activité antimicrobienne.

#### 5.- Références

- GURIB-FAKIM A., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 1 - 93.
- GÓMEZ - CARAVACA A. M., GÓMEZ - ROMERO M., ARRÁEZ - ROMÁN D., SEGURA-CARRETERO A., and FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A., 2006. Advances in the analysis of phenolic



- compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* vol. (41): 1220 - 34.
- MUANDA N. F., KONÉ D., DICKO A., SOULIMANI R., YOUNOS C. 2009. Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts. *ECAM* doi:10.1093, ecam, p109: 1 - 8.
- OMS (Organisation mondiale de la Santé), 2003- Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales, Genève, 83 p.
- OZENDA P., 1983- Flore du sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 617 p.
- TRABUT L., 1935- Flore du nord de l'Afrique (répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique. Latypolithe et Juies carbonel reunies, Alger: 37- 271.
- VOISIN A., 1987- Utilisation des plantes médicinales dans le souf au 19<sup>ème</sup> siècle. Le sahara, 1<sup>er</sup> trimestre, vol. 100:25-28.
- BATTANDIER A., 1882- Le droguier d'un mozabite. Imprimés de bibliothèque nationale de la république française, Paris: 3-12.
- SINGLETON V. L., ORTOFER R., LAMUELA-RAVENTOS R. M., 1999- Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Orlando. Academic Press. 152-178.
- BOIZOT N et CHARPENTIER J-P., 2006- Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des Techniques de l'Inra*.pp 79-82.
- LAMAISON J.L.C. et CARNET A., 1990- Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharm. Acta. Helv.* 65, 315-320.
- HUANG D-J., LIN C-D, CHEN H-J. et LIN Y-H., 2004- Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato constituents *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 179-186.
- PRIETO P., PINEDA M., et AGUILAR M., 1999- Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269: 337-341.
- PONCE A.G., FRITZ R., DEL Valle C. ROURA S.I., 2003- Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Society of Food Science and Technology (Elsevier)*. 36 p: 679-684.
- GONDA S., TÓTH L. PARIZSA P. NYITRAI M. et VASAS G., 2010- Screening of common *Plantago* species in Hungary for bioactive molecules and antioxidant activity. *Acta Biologica Hungarica*, vol. 61:25–34.
- BOUAZIZ M., DHOUB A., LOUKIL S., BOUKHRIS M., et SAYADI S., 2009- Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 8 (24) : 7017-7027.
- KOBEASY M.I., ABDEL-FATAH O.M., ABD EL-SALAM S.M., et ZAH RAT EL-OLA M. M., 2011- Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, vol. 3(3): 83-91.
- KAROU D., DICKO M. H., SIMPORE J., ET TRAORE A. S., 2005- Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (8): 823-828.
- BORCHARDT J.R., WYSE D. L., SHEAFFER C.C., KAUPPI K. L., FULCHER R. G., EHLKE N. J., BIESBOER D. D. ET BEY R. F., 2008- Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 2(5):098-110.

# PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768



## PCBS Journal

Volume 7 N° 1, 2 & 3

2013

**PhytoChem & BioSub Journal (PCBS Journal)** is a peer-reviewed research journal published by Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory. The PCBS Journal publishes innovative research papers, reviews, mini-reviews, short communications and technical notes that contribute significantly to further the scientific knowledge related to the field of Phytochemistry & Bioactives Substances (Medicinal Plants, Ethnopharmacology, Pharmacognosy, Phytochemistry, Natural products, Analytical Chemistry, Organic Synthesis, Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Biochemistry, Computational Chemistry, Molecular Drug Design, Pharmaceutical Analysis, Pharmacy Practice, Quality Assurance, Microbiology, Bioactivity and Biotechnology of Pharmaceutical Interest )

It is essential that manuscripts submitted to PCBS Journal are subject to rapid peer review and are not previously published or under consideration for publication in another journal. Contributions in all areas at the interface of Chemistry, Pharmacy, Medicine and Biology are welcomed.

### Editor in Chief

**Pr Abdelkrim CHERITI**

Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory

### Co-Editor

**Dr Nasser BELBOUKHARI**

Bioactive Molecules & Chiral Separation Laboratory

University of Bechar, 08000, Bechar, Algeria

### Editorial Board

Afaxantidis J. (France), Akkal S. (Algeria), Al Hamel M. (Morocco), Al Hatab M. (Algeria), Aouf N. (Algeria), Asakawa Y. (Japan), Atmani A. (Morocco), Awad Allah A. (Palestine), Azarkovitch M. (Russia), Baalioumer A. (Algeria), Badjah A.Y. (KSA), Balansard G. (France), Barkani M. (Algeria), Belkhiri A. (Algeria), Benachour D. (Algeria), Ben Ali Cherif N. (Algeria), Benayache F. (Algeria), Benayache S. (Algeria), Benharathe N. (Algeria), Benharref A. (Morocco), Bennaceur M. (Algeria), Bensaid O. (Algeria), Berada M. (Algeria), Bhalla A. (India), Bnouham M. (Morocco), Bombarda E. (France), Boucekara M. (Algeria), Boukebouz A. (Morocco), Boukir A. (Morocco), Bressy C. (France), Chehma A. (Algeria), Chemat F. (France), Chul Kang S. (Korea), Dadamoussa B. (Algeria), Daiche A. (France), Daoud K. (Algeria), De la Guardia M. (Brazilia), Dendoughi H. (Algeria), Derdour A. (Algeria), Djafri A. (Algeria), Djebar S. (Algeria), Djebli N. (Algeria), Dupuy N. (France), El Abed D. (Algeria), EL Achouri M. (Morocco), Ermel G. (France), Esnault M. A. (France), Govender P. (South Africa), Jouba M. (Turkey), Hacini S. (Algeria), Hadj Mahamed M. (Algeria), Halilat M. T. (Algeria), Hamed El Yahia A. (KSA), Hamrouni A. (Tunisia), Hania M. (Palestine), Iqbal A. (Pakistan), Gaydou E. (France), Ghanmi M. (Morocco), Gharabli S. (Jordan), Gherraf N. (Algeria), Ghezali S. (Algeria), Gouasmia A. (Algeria), Greche H. (Morocco), Kabouche Z. (Algeria), Kacimi S. (Algeria), Kajima J.M. (Algeria), Kaid-Harche M. (Algeria), Kessat A. (Morocco), Khelil-Oueld Hadj A. (Algeria), Lahreche M.B. (Algeria), Lanez T. (Algeria), Leghseir B. (Algeria), Mahiuo V. (France), Marongu B. (Italia), Marouf A. (Algeria), Meddah B. (Morocco), Meklati F. (Algeria), Melhaoui A. (Morocco), Merati N. (Algeria), Mesli A. (Algeria), Mushfik M. (India), Nefati M. (Tunisia), Ouahrani M. R. (Algeria), Oueld Hadj M.D. (Algeria), Pons J.M. (France), Radi A. (Morocco), Rahmouni A. (Algeria), Raza Naqvi S. A. (Iran), Reddy K.H. (South Africa), Reza Moein M. (Iran), Rhouati S. (Algeria), Roussel C. (France), Saidi M. (Algeria), Salgueiro L.D (Portugal), Salvador J. A. (Spain), Seghni L. (Algeria), Sharma S. (India), Sidiqi S. K. (India), Sour E. (Turkey), Tabti B. (Algeria), Taleb S. (Algeria), Tazerouti F. (Algeria), Vantune N. (France), Villemin D. (France), Yayli N. (Turkey), Youcefi M. (Algeria), Ziyat A. (Morocco), Zouieche L. (Algeria), Zyoud H. (Palestine).



# PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768

## PCBS Journal

*PCBS  
Journal*

Volume 7 N° 2

2013



Edition LPSO  
Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory  
<http://www.pcbsj.webs.com> , Email: phytochem07@yahoo.fr

## Caractérisation physico-chimique et biochimique des bulbes d'*Urginea noctiflora* (Liliaceae) récoltée dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est Algérie): Activités antioxydantes et antimicrobiennes

Zakaria BOUAL<sup>1</sup>, Abdellah KEMASSI<sup>1</sup>, Aicha HAMID OUDJANA<sup>1</sup>, Philippe MICHAUD<sup>2</sup> et Mohamed Didi OULD EL HADJ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides  
Université Kasdi Merbah-Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire des Glucides (EPMV) CNRS FRE2779, IUT/GB, UPJV  
Avenue des Facultés Le Bailly, 80025 Amiens Cedex, France

Received: March 17, 2013; Accepted: June 25, 2013  
Corresponding author Email biozakaria@yahoo.fr  
Copyright © 2013-POSL

**Résumé-** La présente étude rapporte sur la connaissance d'*Urginea noctiflora*, une plante spontanée à caractère médicinaal récoltée dans la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien). Les bulbes de cette plante donnent des teneurs en cendres de  $26.74 \pm 1.31\%$  de la matière sèche, avec un taux de calcium de  $33.09 \pm 8.31$  ppm, de sodium de  $80 \pm 6.37$ , de potassium de  $55.18 \pm 9.48$  ppm et de magnésium de  $18.91 \pm 3.51$  ppm. Pour les protéines, il est noté  $6.44 \pm 0.79\%$  par rapport à la matière sèche, alors que les oses totaux sont de  $18.78 \pm 0.14\%$ . Les lipides semblent le plus faible avec une moyenne de  $0.99 \pm 0.13\%$  de la matière sèche. Les fibres semblent les composés majoritaires ( $25.80 \pm 0.82\%$ ). Les teneurs en flavonoïdes, sont compris entre  $0,158 \pm 0.06$  mg pour l'extrait d'hexane et  $1,03 \pm 0.167$  mg pour l'extrait éthanolique. Les polysaccharides hydrosolubles sont de  $5.33\%$ . Le pouvoir antioxydant des extraits analysés varie entre  $0.11 \pm 0.05$  et  $4.56 \pm 0.13$  mg équivalent vitamine C par gramme de matière sèche pour les extraits d'hexane et éthanolique respectivement. Le test de l'activité antimicrobienne des différents extraits a montré que d'*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium*, et *Candida albicans*, sont inhibées au moins par l'un des extraits. Les extraits apolaires présentent plus d'activité avec des zones d'inhibition pouvant atteindre  $1.36 \pm 0.05$  cm pour l'extrait d'hexane contre *S. thyphimurium*. Les extraits polaires sont plus actifs contre *Candida albicans*, avec des zones d'inhibition allant de  $1.13 \pm 0.05$  à  $1.25 \pm 0.13$  cm.

**Mots clés:** *Urginea noctiflora*, extraits, activités, médicinales, Sahara.

### Physico-chemical and biochemical characterization of *Urginea noctiflora* bulbes (Liliaceae) harvested from Ghardaïa (Septentrional Sahara Algerian): antioxidant and antimicrobial activities

**Abstract-** *Urginea noctiflora* a spontaneous plant used as a traditional medicine in Ghardaïa (Septentrional Sahara Algerian). The bulbs were characterized and revealed the average values:  $26.74 \pm 1.31\%$  total ashes, with a rate of  $33.09 \pm 8.31$  ppm of Calcium,  $80 \pm 6.37$  ppm of Sodium,  $55.18 \pm 9.48$  ppm of Potassium and  $18.91 \pm 3.51$  ppm of Magnesium. For proteins, it is noted  $6.44 \pm 0.79\%$ , while the total carbohydrates are  $18.78 \pm 0.14\%$ . Lipids seem lower with an average of  $0.99 \pm 0.13\%$  of dry matter. Fibers appear to be major compounds ( $25.80 \pm 0.82\%$ ). The amounts of total phenolics varied widely in the extracts and ranged from  $0.48 \pm 0.28$  to  $9.81 \pm 1.84$  mg GAE/g dry material in hexane and ethanol extracts respectively. The amounts of flavonoids were ranged from  $0.158 \pm 0.06$  mg to  $1.03 \pm 0.167$  mg. Water-soluble polysaccharides are  $5.33\%$ . Total antioxidant capacity of the plant extracts ranged from  $0.11 \pm 0.05$  to  $4.56 \pm 0.13$  mg vitamin C equivalent per gram of dry matter for the hexane extracts and

ethanol respectively. All extracts were active against some or the entire tested microorganisms *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimurium*, and *Candida albicans*. In agar medium, the non polar extracts are more effective than the polar extracts, on most of the micro-organisms tested, which that of hexane had the highest activities as  $1.36\pm 0.05$  cm Inhibition Zones against *S. thyphimurium*. Polar extracts had the higher activities against *Candida albicans*, the Inhibition Zones are between  $1.13\pm 0.05$  and  $1.25\pm 0.13$  cm.

**Keywords:** *Urginea noctiflora*, extracts, activities, medicinal, Sahara.

## 1.- Introduction

La pratique le long des siècles de la médecine traditionnelle et l'expérience transmise de génération en génération semblent être preuve de l'innocuité et de l'efficacité de cette médecine (OMS, 2003). Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquentes ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. La recherche de nouvelles molécules, plus actives, bon marché, sans effets secondaires trop marqués, est aujourd'hui une urgence pour l'homme. On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivés, des terpènes, stéroïdes, des composés polyphénoliques, et des polysaccharides. Seule une poignée de ces richesses a été explorée. Le Sahara Septentrional Est algérien possède de nombreuses espèces susceptibles de fournir des principes actifs, utilisées dans différents domaines pour leurs propriétés thérapeutiques et organoleptiques, notamment odorantes (parfumerie, cosmétique), pharmaceutiques (aromathérapie), gustatives (additifs alimentaires) ou encore comme sources d'isolats pour les hémisynthèses. Ces plantes spontanées sont à l'origine de produits à très forte valeur ajoutée qui peuvent contribuer au développement économique de la région. Le présent travail est une contribution à la connaissance d'une plante spontanée à caractère médicinal issue de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional Est algérien), *Urginea noctiflora*. L'étude porte sur la composition physico-chimique et biochimique des bulbes de cette plante spontanée, ainsi sur leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

## 2.- Matériel et méthodes

### 2.1.- Matériel végétal

*Urginea noctiflora*, plante annuelle à bulbe volumineux profondément enfoncé dans le sol, les feuilles étroites, un peu charnues, enroulées en tire-bouchon, hampes de 20 à 40 cm, portant 4 à 10 fleurs gris-rosé, penchées s'ouvrant la nuit en recourbant leurs pétales vers l'arrière comme chez les cyclamens (OZENDA, 1991). Le bulbe d'*U. noctiflora* est utilisé traditionnellement pour le traitement des plaies et maux d'oreille dans le Sahara septentrional Est Algérien, en compresse et en poudre, (OULD EL HADJ et al., 2003). La plante est récoltée à d'Oued Lachebour située dans la région de Ghardaïa (Sahara Septentrional Est algérien) entre les mois d'Avril et Mai. Des bulbes d'*U. noctiflora* sains sont retenus et débarrassés de leurs pellicules sèches, des racines et du collet. Après séchage, les fragments de bulbes sont conservés dans des bouteilles en verre dans un milieu sec à l'abri de la lumière, qui a servi pour l'étude de la composition totale et pour la préparation des extraits. (DOASSEM, 2002).

## 2.2.- Souches microbiennes

Les souches utilisées proviennent de différents prélèvements cliniques du laboratoire d'analyses médicales IBN ROCHD Ghardaïa. Il s'agit d'espèces à Gram négatif (-) dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, d'espèce à Gram positif (+) représentées par *Staphylococcus aureus*. De même, *Candida albicans*, une levure est testée.

## 2.3.- Etude de la composition chimique et biochimique

Les principaux constituants chimiques de bulbes d'*Urginea noctiflora* sont caractérisés par des réactions de coloration. Il s'agit du taux des protéines, des oses constitutifs, des lipides, et des fibres. Par contre pour déterminer la teneur en cendres, on fait appelle à des techniques physico-chimiques. Les cendres totales sont déterminées par incinération du matériel végétal dans un four à moufle électrique de type Heraeus 6072 (incinération à  $525 \pm 25$  °C), jusqu'à obtention d'une cendre blanchâtre de poids constants (AUDIGIE et al., 1984). Les éléments minéraux sont dosés par spectroscopie à flamme. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de BRADFORD. La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie (AUTRAN, 1991). Le dosage des oses totaux est effectué selon la méthode de DUBOIS et al. (1956), en présence de l'acide sulfurique concentré. Les oses sont déshydratés en composés de la famille des dérivés furfurique. Ces produits se condensent avec le phénol pour donner des complexes jaune-orangé. La teneur en oses totaux est déterminée par spectrométrie (UV-1800 Shimadzu) à une longueur d'onde de 490 nm par référence à une gamme étalon de glucose. Les corps gras du matériel végétal sont extraits par l'éther de pétrole au moyen de soxhlet (Velp Scientifica-SER 148 Manual). La teneur en lipides s'exprime par le pourcentage en masse. La teneur en cellulose brute est dosée par l'appareil Raw Fiber Extractor (VELP Scientifica) et s'exprime en pourcentage en masse, rapporté au produit sec.

## 2.4.- Étude des composés phénoliques

### 2.4.1.- Extractions par macération

A 20g de poudre est ajouté 200 ml d'Hexane et placés sous agitation pendant 24 heures. Après filtration sur papier Wathman, le marc est ensuite utilisé pour deux autres macérations dans les mêmes conditions. Le marc est mis en agitation avec 200 ml de Chloroforme pendant 24 heures et après filtration sur papier Wathman, le marc est utilisé pour deux autres macérations dans les mêmes conditions. Puis 200 ml d'acétate d'éthyle est ajouté au marc est laissé pendant trois jours. Après filtration sur papier Wathman, le résidu est repris par 200 ml d'éthanol à 80% et laissé sous agitation pendant 24 heures. À la fin de l'extraction avec les solvants organiques, le marc a été séché pendant 24 heures. Les solutions sont filtrées sous vide à l'aide de filtres en microfibrilles de verre Wathman. Les extraits d'hexane, de chloroforme, d'acétate d'éthyle, et d'éthanol sont concentrés sous vide à 40 °C au Rotor vapor.

### 2.4.2.- Dosage des phénols totaux

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). 50 µl de chaque extrait dissous dans le méthanol sont ajoutés à 100µl du réactif de Folin Ciocalteu dilué 10 fois, après 10 mn, 500 µl d'une solution de carbonate du sodium à 20% (m/v) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 2 heures d'incubation. Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec

l'acide gallique (0-200 µg/ml) et sont exprimées en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (µg EAG/mg).

### **2.4.3.- Dosage des flavonoïdes**

Le dosage des flavonoïdes est effectué par une méthode adaptée par LAMAISON et CARNET (1990); HUANG *et al.*, (2004), en utilisant le trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) comme réactif. 1ml de chaque extrait et du standard, préparés dans le méthanol avec dilutions convenables a été ajoutés à un volume égal d'une solution de 2% d'AlCl<sub>3</sub>. Le mélange est agité, et l'absorbance à 367 nm, est lue après 10 minutes d'incubation. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la rutine (0-35µg/ml), et sont exprimées en milligramme d'équivalent de la rutine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g).

## **2.5.- Étude des polysaccharides**

### **2.5.1.- Extractions des polysaccharides hydrosolubles**

Le marc séché est porté à 80°C avec 3×100 ml d'eau distillée, pendant trois heures à chaque fois (GUO *et al.*, 2007). La solution obtenue est filtrée à travers un filtre de porosité 100 µm. Le filtrat est concentré à 60°C jusqu'à l'obtention du 1/3 du volume initial, dans un Rotor vapor (EBRINGEROVA *et al.*, 2003). Les polysaccharides du concentrât sont précipitées à l'aide de 3 volumes d'éthanol à 75% pendant 24 heures à une température de 4°C. Après centrifugation à 3560g pendant 10 mn, le culot est récupéré puis lavé 3 fois par éthanol à 75% (EBRINGEROVA *et al.*, 2003; SEPULVEDA *et al.*, 2006), avant d'être lyophilisé (BIRINGANINE *et al.*, 2004). Le lyophilisat obtenu, représente l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles.

#### **2.5.1.1.- Etude de la composition des extraits de polysaccharides hydrosolubles**

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de BRADFORD (AUTRAN, 1991). La concentration en protéines est obtenue par référence avec une gamme étalon de sérum albumine bovine, après coloration au bleu de Coomassie. Le dosage des oses constitutifs des polysaccharides repose sur la réaction des dérivés furfuriques obtenus par action à chaud, d'un acide concentré comme l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pour divers composés aromatiques, telle que le résorcinol (1,3- dihydroxybenzène) pour le dosage des oses neutres (MONSIGNY *et al.*, 1988), et le méta-hydroxydiphényle pour le dosage des acides uroniques (BLUMENKRANTZ *et al.*, 1973). La concentration en oses neutres est obtenue par référence à une gamme étalon d'arabinose et celle des oses acides avec une gamme étalon d'Acide Glucuronique (MONSIGNY *et al.*, 1988).

#### **2.5.1.2.- Chromatographie sur couche mince des oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles**

Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse (BIRINGANINE *et al.*, 2004). 25 mg de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles lyophilisé est hydrolysé par 2 ml d'Acide Trifluoroacétique 4 M, à 80°C pendant 5 heures, dans des tubes fermés (BIRINGANINE *et al.*, 2004). Après refroidissement, l'hydrolysate est centrifugé à 2000 g pendant 5 mn. Le surnageant est récupéré. L'acide est évaporé à l'aide d'un dessiccateur sous vide. Une fois l'hydrolyse effectuée, les monosaccharides libérés, sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM).

#### **- Préparation des solutions étalons**

A 25 mg de chaque ose étalon (galactose, arabinose, glucose, xylose, mannose, rhamnose, acide galacturonique, et acide glucuronique), est ajouté 2,5 ml d'eau distillée.

### **- Types des plaques**

Ce sont des plaques prêtes à l'emploi, de gel de silice (Silica gel 60 F254) de 0.25 mm d'épaisseur sur feuille de verre.

### **- Préparation de la phase mobile**

Elle est constituée de butanol-acide acétique-eau dans les proportions de 2-1-1 (RUIZ, 2005).

### **- Réalisation de CCM et révélation**

Pour l'étude qualitative de la composition en oses des polysaccharides, les hydrolysats sont déposés en parallèle, sur la même plaque, que la série d'étalons composés d'arabinose, de galactose, de glucose, de mannose, de xylose, de fructose et d'acide glucuronique. Le développement du chromatogramme est effectué de façon ascendante jusqu'au front. Après séchage, la révélation du chromatogramme est faite en pulvérisant sur la plaque le réactif aniline acide Diphenylaminophosphorique, et en séchant à l'étuve à 100°C pendant 10 mn (PAULSEN *et al.*, 2002).

### **2.5.2.- Extractions des polysaccharides alcali solubles**

Le marc obtenu après extractions des polysaccharides hydrosolubles est séché pendant 24 heures. 250 ml de solution de 0.5 M NaOH, est ajouté puis agité pendant 2 heures. Après 30 mn de repos, le surnageant est récupéré et neutralisé par la solution de 2 M HCl, puis centrifugé à 6000xg pendant 30 mn, pour séparer le gel et la solution. La solution obtenue représente l'extrait des polysaccharides alcali solubles à 0.5M. Une deuxième extraction est effectuée suivant les mêmes étapes mais à 2 M NaOH pour obtenir l'extrait des polysaccharides alcali solubles à 2M. Les extraits obtenus sont séchés pour calculer le rendement d'extraction (Guo *et al.*, 2007).

### **2.6.- Tests des activités biologiques**

#### **2.6.1.- Activité Antioxydante totale**

L'activité antioxydante totale des extraits de bulbe (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle, et éthanol) est évaluée par la méthode de PRIETO *et al.* (1999). Le pouvoir antioxydant est mesuré par spectrophotomètre en utilisant la méthode de phosphomolybdate, basée sur la réduction de phosphomolybdate ( $\text{Mo}^{6+}$ ) au ( $\text{Mo}^{5+}$ ) par les antioxydants présents dans les extraits. On prépare 100 ml d'un mélange des trois solutions 0,6M d'acide sulfurique, 28 mM phosphate sodium et 4M molybdate ammonium. 200  $\mu\text{l}$  de chaque extrait dilué, sont ajoutés à 2ml de la solution précédente. Le mélange est placé dans un bain marie à une température de 95°C pendant 90 mn, après refroidissement l'absorbance est mesurée à 695 nm. L'acide ascorbique utilisé comme référence pour établir une courbe d'étalonnage. L'activité antioxydant est exprimé en mg équivalent en acide ascorbique (AE)/g d'échantillon.

#### **2.6.2.- Activité Antimicrobienne**

Pour les essais des activités antimicrobiennes il est utilisé la technique de diffusion en milieu gélosés de Muller Hinton en boîtes de Petri. Les milieux sont ensemencés par quelques millilitres de l'inoculum ( $10^6$  UFC/ml) de façon à recouvrir toute la surface gélosée. Les boîtes de pétri sont ensuite mises à sécher 15 mn à 37°C. Des disques absorbants stériles de 4 mm de diamètre, imprégnés de 3  $\mu\text{l}$  d'extrait et des disques d'antibiotiques type céfotaxime, Sulfaméthoxazole, oxacilline, Gentamicine, et natamycine sont utilisés comme des témoins, sont déposés sur une gélose inoculée avec les souches. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La diffusion de l'extrait dans la gélose permet de suivre l'inhibition et la croissance des germes qui se traduit par une zone claire autour de disque dite zone d'inhibition. L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de



la croissance microbienne autour du puits contenant l'extrait à tester. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé (Ponce et *al.*, 2003).

### 3.- Résultats et discussions

Les résultats d'analyses physico-chimiques de bulbes d'*Urginea noctiflora* sont présentés sur le tableau 1. La teneur en cendres est de  $6.74 \pm 1.31\%$  de la matière sèche, semble à celle d'*U.indica* (56.75%) (PANDURANGA MURTHY et *al.* 2011). Le taux de Calcium exprimé en ppm par rapport à la matière sèche est de  $33.09 \pm 8.31$ . Pour le Sodium, le taux est de  $80 \pm 6.37$ . Tandis que, Le taux de Potassium est de  $55.18 \pm 9.48$ . Le taux de magnésium est de  $18.91 \pm 3.51$  ppm. Pour les protéines, le taux est de  $6.44 \pm 0.79\%$  par rapport à la matière sèche, a vu des bulbes d'*U. maritima* qui donne un pourcentage de  $5.60 \pm 0.39\%$  (METIN et BURUN, 2010), semble appréciable. Les teneurs des oses totaux sont de  $18.78 \pm 0.14\%$ , semblent inférieures à celles des bulbe d'*U. sanguinea* (FOUKARIDIS et *al.*, 1995). Le taux des lipides est de  $0.99 \pm 0.13\%$  de la matière sèche. Les fibres restent les composés majoritaires. Ils représentent  $25.80 \pm 0.82\%$  de la matière sèche, demeurent faible par rapport de ceux d'*U. pancration* (68,40%) (MARX et *al.*, 2006).

**Tableau 1-** Composition chimique et biochimique de bulbes d'*U. noctiflora*

Composition de bulbes d' <i>U. noctiflora</i>	
Cendres (%)	$6.74 \pm 1.31$
Ca (ppm)	$33.09 \pm 8.31$
Na (ppm)	$80 \pm 6.37$
K (ppm)	$55.18 \pm 9.48$
Mg (ppm)	$18.91 \pm 3.51$
Protéines (%)	$6.44 \pm 0.79$
Oses totaux (%)	$18.78 \pm 0.14$
Lipides(%)	$0.99 \pm 0.13$
Fibres(%)	$25.80 \pm 0.82$

Le tableau 2 laisse apparaître les résultats de rendements d'extraction, les taux de polyphénols totaux, des flavonoïdes, et les activités anti-oxydantes (AAO) des extraits. Les résultats d'extractions montrent que parmi les quatre extraits, l'extrait éthanolique représente le rendement le plus élevé 6.53%. L'extrait d'hexane est faible, suivi par l'extrait chloroformique et d'acétate d'éthyle qui ont un rendement moyen de 2%. Les phénols totaux montrent que les extraits polaires (d'acétate d'éthyle et éthanolique), sont les plus riches avec  $4.66 \pm 0.16$  mgGAE/g et  $9.8 \pm 1.84$  mg GAE/g, respectivement. Les taux de flavonoïdes sont inférieurs à celles des composés phénoliques dans tous les extraits. Les extraits polaires représentent les teneurs les plus élevés en flavonoïdes, soit  $0.52 \pm 0.02$  mg RE/g et  $1.03 \pm 0.167$  mg RE/g respectivement. Les valeurs des AAO des extraits varient entre  $0.11 \pm 0.05$  mg VCE/g et  $4.56 \pm 0.13$  mgVCE/g pour l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait éthanolique respectivement.

**Tableau 2-** Rendement d'extraction et teneurs en phénols totaux, en flavonoïdes et activités antioxydantes (AAO) des extraits

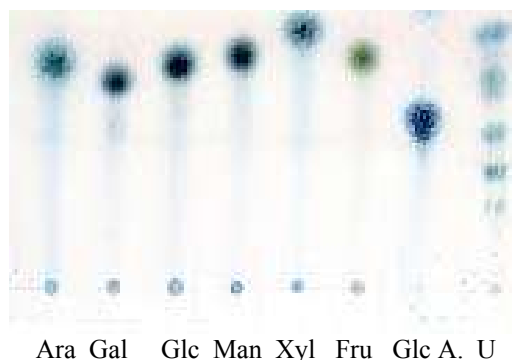
	<b>Rendement (%)</b>	<b>Polyphénols (mg GAE/g)</b>	<b>Flavonoïdes (mg RE/g)</b>	<b>AAO (mg VCE/g)</b>
Hexane	0.81	0.48±0.28	0,158±0.06	0.11±0.05
Chloroforme	2.18	1.19±0.50	0,31±0.1	1.32±0.01
Acétate d'éthyle	2.6	4.66±0.16	0,52±0.02	3.76±0.02
Éthanol	6.53	9.81±1.84	1,03±0.167	4.56±0.13

Le tableau 3 présente les rendements, la composition des extraits bruts de polysaccharides hydrosolubles et alcalisolubles, et les types des oses constitutifs des polysaccharides hydrosolubles. Il apparaît que le rendement massique d'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles est de 5.33%. Pour les Polysaccharides alcalisolubles, qui représentent la cellulose et les hémicelluloses on trouve 7.34% par rapport à l'extrait de 0.5 M KOH. Les dosages colorimétriques des oses neutres et des acides uroniques renseignent sur la part des acides uroniques et les type des polymères. Les résultats obtenus révèlent la présence des polysaccharides hydrosolubles acides. L'analyse de la composition monosaccharidique révèle l'hétérogénéité des polymères ce qui se traduit par la grande diversité des monosaccharides dont le glucose, le fructose, l'arabinose, le mannose, et l'acide glucuronique.

**Tableau 3-** Composition de l'extrait brut de polysaccharides de bulbes d'*U. noctiflora*

<b>Polysaccharides hydrosolubles:</b>	
Rendement (%)	5.33
Oses neutres (%)	57.53±2.29
Acides uroniques (%)	11.89±3.11
Protéines (%)	18.30±3.99
Type des oses :	Fructose, Glucose, Mannose, Arabinose, Acide glucuronique.
<b>Polysaccharides alcalisolubles:</b>	
Rendement d'extraction à 0.5 M KOH (%)	7.34
Rendement d'extraction à 2 M KOH (%)	7.05





**Fig. 1-** Chromatogramme d'hydrolysats des polysaccharides hydrosolubles (U: *U. noctiflora*)

Les valeurs des diamètres d'inhibition enregistrés se trouvent consignées dans le tableau 4. Les résultats ont montré que les diamètres d'inhibition ont varié selon le type de l'extrait et de la souche testée. Tous les extraits se sont révélés actifs avec un degré différent, lié au contenu des extraits aux substances à activité antimicrobienne. Les extraits apolaires semblent avoir des effets notables. Tandis que, les extraits polaires ont montré une activité antimicrobienne un peu moindre, l'extrait d'Acétate d'éthyle a montré des zones d'inhibition avec toutes les souches microbiennes, alors l'extrait éthanolique a une activité contre *Salmonella thyphimurium*. Une activité remarquable contre *Candida albicans* dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 0.76 cm à 1.2 cm sont enregistrés.

**Tableau 4-** Zones d'inhibition (cm) des souches microbiennes par différents extraits

Extraits	Souches microbiennes testées				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>	<i>Candida albicans</i>
Hexane	0.86±0.05	0.76±0.05	---	1.36±0.05	0.76±0.02
Chloroforme	0.91±0.02	0.56±0.05	---	1.1±0.1	0.86±0.02
Acétate d'éthyle	0.6±0.0	0.55±0.05	0.73±0.02	1.1±0.1	1.25±0.13
Éthanol	---	---	---	0.8±0.0	1.13±0.05

## Conclusion

La détermination des rendements d'extraction, donnent un rendement élevé pour l'extrait éthanolique. Le dosage des composés phénoliques dans les quatre extraits a révélé des teneurs appréciables en polyphénols avec des quantités appréciables en flavonoïdes. Pour les polysaccharides, les rendements d'extraction, laisse apparaître une richesse en polysaccharides hydrosolubles. Ils sont composés de polysaccharides acide et hétérogène avec une composition variable en monosaccharide. L'activité antioxydante des différents extraits révèle que les extraits polaires s'avèrent les plus riches en composés phénoliques et les extraits les plus actifs, alors les extraits apolaires sont moins actifs. Le test de l'activité antimicrobienne des différents extraits a montré que toutes les souches microbiennes testées (bactéries et levure) sont inhibées au moins par l'un des extraits, dont les extraits apolaires qui ont plus d'activité avec des zones d'inhibition peuvent atteindre 1.36 cm.

## Références

- [1] OMS, 2003- Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales. Genève, 83 p.
- [2] OZENDA P., 1983- Flore du sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 617 p.
- [3] QUEZEL P. et SANTA S., 1962- Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris : 193,201.
- [4] OULD EL HADJ M. D., HADJ- MAHAMMED M., ZABEIROU H., et CHEHMA A., 2003- Importance des plantes spontanées médicinales dans la pharmacopée traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional Est algérien). Annales de l'INRAT, vol. 76: 225-240.
- [5] DOASSEM J., 2002- Fabrication artisanale de la poudre d'oignon. Technologie alimentaire, fiche Technique 20 : 1-2.
- [6] AUDIGIE C., FIGARELLA J. et ZONSZAIN F., 1984- Manipulations d'analyse biochimique. Ed. Doin, Paris: 3-4.
- [7] AUTRAN J. C., 1991- Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Ed. Tec et Doc, Paris: 115-137.
- [8] PONCE A. G., FRITZ R., DEL Valle C. ROURA S. I., 2003- Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of Food Science and Technology: 679-684.
- [9] SINGLETON V. L., ORTOFER R., LAMUELA-RAVENTOS R. M., 1999- Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology. Orlando, Academic Press: 152-178.
- [10] BOIZOT N et CHARPENTIER J-P., 2006- Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre fruitier. Le cahier des Techniques de l'Inra : 79-82.
- [11] LAMAISON J.L.C. et CARNET A., 1990- Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. Pharm. Acta. Helv. 65 : 315-320.
- [12] HUANG D-J., LIN C-D, CHEN H-J. ET LIN Y-H., 2004- Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam 'Tainong 57') constituents Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 179-186.
- [13] GUO, Q., CUI, S.W., WANG, Q., YOUNG, J.C., 2007- Fractionation and Physicochemical Characterization of Psyllium Gum. Carbohydrate Polymers : 1-30.
- [14] EBRINGEROVA A., KARDOSOVA A., HROMADKOVA Z. et HRIBALOVA V., 2003- Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. Fitoterapia, vol. 74: 52-61.
- [15] SEPULVEDA E., SAENZ C., ALIAGA E., et ACEITUNO C., 2007- Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. Journal of arid environments, vol. 68: 534-545.
- [16] BIRINGANINE G., VRAY B., VERCRUYSSSE V., VANHAELEN-FASTRE R., VANHAELEN M. et DUEZ P., 2004- Polysaccharides extracted from the leaves of *Plantago palmata* Hook induce nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by interferon- $\gamma$ -activated macrophages. Nitric oxide, vol. 12: 1-8.
- [17] MONSIGNY M., PETIT C. et ROCHE A. C., 1988- Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acids micromethod. Analytical biochemistry, vol. 175: 525-530.
- [18] BLUMENKRANTZ N. et ASBOE-HANSEN G., 1973- New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical biochemistry, vol. 54: 484-489.
- [19] RUIZ G., 2005- Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat de l'université de Limoges: 36-38.
- [20] PANDURANGA MURTHY G., MAMTHARANI D.R., TEJAST.S. et SUARLIKERIMATH N. M., 2011- *Phytochemical analysis, in vitro* anti-bacterial and antioxidant activities of wild onion sps. International Journal of Pharma and Bio Sciences, vol. 2:230-237.
- [21] METIN M., BURUN B., 2010- Effects of the High Doses of *Urginea maritima* (L.) Baker Extract on Chromosomes. CARYOLOGIA, vol. 63(4): 367-375.
- [22] FOUKARIDIS G. N., OSUCH E., MATHIBE L., TSIPA P. 1995-The ethnopharmacology and toxicology of *Urginea sanguinea* in the Pretoria area. Journal of Ethnopharmacology, 49: 77-79.
- [23] MARX J., PRETORIUS E., et BESTER M.J., 2006- Effects of *Urginea sanguinea*, a traditional asthma remedy, on embryo neuronal development. Journal of Ethnopharmacology, 104: 315.

# PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768



*PCBS  
Journal*



Edition LPSO  
<http://www.pcbsj.webs.com>  
Email: phytochem07@yahoo.fr

